



Miguel Alexandre Lopes de Carvalho

Licenciado em Ciências da Engenharia Biomédica

Estudo Imagiológico em Ressonância Magnética de doentes com Doença de Parkinson Late Stage

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadora: Professora Doutora Rita G. Nunes, Investigadora
auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade de
Lisboa

Co-orientadora: Professora Doutora Sofia Reimão, Médica
Neurorradiologista, Assistente Hospitalar do Centro
Hospitalar Lisboa Norte, EP – Hospital de Santa
Maria e Professora auxiliar Convidada de Imagiolo-
gia da Faculdade de Medicina da Universidade de
Lisboa

Júri

Presidente: Doutora Carla Maria Quintão Pereira
Arguente: Doutor Ricardo Nuno Pereira Verga e Afonso Vigário
Vogal: Doutora Rita Homem de Gouveia Costanzo Nunes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2016

Estudo Imagiológico em Ressonância Magnética de doentes com Doença de Parkinson Late Stage

Copyright © Miguel Alexandre Lopes de Carvalho, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Este documento foi gerado utilizando o processador (pdf) \LaTeX , com base no template “unlthesis” [1] desenvolvido no Dep. Informática da FCT-NOVA [2]. [1] <https://github.com/joaomlorenco/unlthesis> [2] <http://www.di.fct.unl.pt>

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa e a todos os professores, que contribuíram para o excelente curso que tive oportunidade de ingressar.

Ao Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pela oportunidade e acolhimento.

Um agradecimento especial à Doutora Rita Nunes e Doutora Sofia Reimão, pela disponibilidade, simpatia, paciência, entusiasmo, orientação e conhecimentos transmitidos durante estes meses. Agradeço a oportunidade que me deram de poder ter participado neste projeto extraordinário.

Agradeço à Dra. Margherita Fabbri pela simpatia e ajuda preciosa.

Aos meus pais pela educação que me proporcionaram, por todos os conhecimentos que me transmitiram e apoio incondicional. Ao meu irmão pela companhia, apoio e amizade ao longo destes anos. Agradeço aos meus avós, Bitá, Geninha, Mário e Rogério por estarem sempre presentes ao longo do meu percurso. À minha família em geral, por serem um suporte fundamental na minha vida.

Quero agradecer à Marta, Patrícia, Rafa, Daniela G., Daniela M., Vera, Calisto, Carolina, Gonçalo e Raquel, por estes seis meses incríveis de amizade, animação e espírito de entreajuda.

À Ana Pepe, Susana, Mariana, Herberto, MV e Eliseu por estes 5 anos que passámos juntos. Foram os melhores anos da minha vida, muito devido à verdadeira amizade construída, que certamente perdurará.

RESUMO

A técnica de imagem por ressonância magnética (IRM) tem sido bastante utilizada no estudo dos estádios iniciais da Doença de Parkinson (DP), focando-se sobretudo no diagnóstico diferencial. Adicionalmente, os estudos de imagem são muito importantes na possível avaliação da progressão da doença, em especial nos estádios mais avançados. Surge assim a necessidade de caracterizar os principais aspetos imagiológicos da DP *late stage*. Esta caracterização é fundamental, na medida em que permitirá definir o fenótipo *late stage* e documentar as alterações fisiopatológicas que ocorrem neste estágio, que poderão auxiliar no processo de acompanhamento da doença e na otimização de tratamentos.

Neste trabalho, foi otimizada uma ferramenta de segmentação semiautomática que permite medir a área correspondente ao sinal hiper-intenso da *substantia nigra* (SN), em imagens sensíveis à neuromelanina. O algoritmo de segmentação *Confidence* com os parâmetros de segmentação 2 de multiplicador, 2 de nº de iterações e 1 de raio em imagens previamente filtradas com o filtro *Gaussian Blur* do OsiriX, mostraram ser a melhor combinação para a correta deteção das áreas de interesse.

Foram efetuadas medições em imagens de indivíduos saudáveis e doentes em diferentes estádios da doença. Verificou-se uma diminuição significativa das áreas entre controlos saudáveis e doentes, permitindo diferenciá-los com uma elevada sensibilidade e especificidade. Entre os doentes, verificou-se uma tendência de redução das áreas à medida que a doença progride. Para além desse estudo, foram avaliadas alterações volumétricas das estruturas cerebrais envolvidas, verificando-se que no hipocampo ocorre uma atrofia significativa nos doentes *late stage* em comparação com os outros estádios da doença.

Com este trabalho foi possível estudar possíveis biomarcadores da progressão da DP, assim como otimizar uma ferramenta de segmentação, preparada para utilização clínica na monitorização da doença.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, *late stage*, Imagem por ressonância magnética, Segmentação, Neuromelanina

ABSTRACT

The technique of Magnetic resonance imaging (MRI) has been extensively used to study Parkinson's Disease (PD) early stages, focusing particularly on the differential diagnosis. Thus, the necessity to find new imaging characteristics that could help monitoring the disease progression and to characterize the main imaging aspects of the late stage of Parkinson's Disease emerges. This study aims to improve the knowledge on how this disease evolves, by characterizing specific imaging details that could help identify the pathophysiological mechanisms involved in the disease progression, and would therefore be likely to improve the clinical diagnosis, and help to adjust the treatment plan of these patients.

Therefore, a semi-automated segmentation tool was optimized, specialized in the detection of the substantia nigra's (SN) high signal area, using neuromelanin-sensitive MRI. A region growing algorithm (Confidence) with the segmentation parameters of 2 - multiplier, 2 - Iterations and 1 - Radius, as well as the previous application of the Gaussian Blur filter, proved to be the best procedure for the correct identification of the area of interest.

The SN neuromelanin signal was measured in early stage PD patients and healthy subjects. The area was markedly decreased in the PD groups compared with age-matched controls. It was possible to discriminate PD patients from healthy individuals with high sensitivity and specificity. Among the PD groups, a tendency for a reduction of the area was observed along the disease progression. Furthermore, volumetric changes on the involved brain structures were evaluated. A significant hippocampus atrophy was found on the late stage group compared with early stage patients.

With this project, it was possible to characterize crucial biomarkers for the disease progression and to optimize a segmentation tool, which can be clinically used to monitor the progress of Parkinson's disease.

Keywords: Magnetic resonance imaging, Parkinson's Disease, segmentation, late stage, neuromelanin

ÍNDICE

Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xix
Siglas	xxi
1 Introdução	1
1.1 Contextualização	1
1.2 Objetivos	2
1.3 Estrutura da Tese	3
2 Revisão da literatura	5
2.1 Imagem por Ressonância Magnética	5
2.1.1 Pincípios Físicos	5
2.1.2 Sequências e formação de imagem	6
2.1.3 Imagens Ponderadas	7
2.2 Processamento de imagem	7
2.2.1 Segmentação de imagem	7
2.2.2 Métodos de filtragem	9
2.3 Doença de Parkinson	12
2.3.1 Doença de Parkinson <i>late stage</i>	13
2.3.2 Neuromelanina	14
2.4 Técnicas de Diagnóstico	15
2.4.1 Técnicas de PET e SPECT aplicadas à Doença de Parkinson	15
2.4.2 Técnicas de IRM aplicadas à Doença de Parkinson	15
3 Otimização e validação do procedimento de segmentação	21
3.1 Otimização da ferramenta de segmentação do OsiriX para quantificação da neuromelanina	21
3.1.1 Materiais e métodos	22
3.1.2 Resultados	29
3.1.3 Discussão	35

3.2	Ferramenta de segmentação do OsiriX vs. MATLAB no diagnóstico diferencial da Doença de Parkinson	38
3.2.1	Materiais e métodos	38
3.2.2	Resultados	41
3.2.3	Discussão	45
4	Estudos Imagiológicos em doentes com Doença de Parkinson <i>Late Stage</i>	49
4.1	Materiais e métodos	49
4.1.1	Descrição da amostra	49
4.1.2	Análise das imagens de ressonância magnética	50
4.1.3	Severidade e Assimetria na Doença de Parkinson	54
4.1.4	Disfunções cognitivas na Doença de Parkinson <i>late stage</i>	55
4.1.5	Análise estatística	55
4.2	Resultados	56
4.2.1	Análise das áreas da SN	56
4.2.2	Análise das razões de contraste (RC)	59
4.2.3	Correlação da avaliação clínica com as áreas da <i>substantia nigra</i> . .	64
4.2.4	Análise volumétrica	65
4.3	Discussão	71
5	Conclusão	75
5.1	Conclusões finais	75
5.2	Perspetivas futuras	76
	Bibliografia	77
A	Interface desenvolvida	83

LISTA DE FIGURAS

2.1	IRM ao cérebro, plano sagital. a) Imagem ponderada em T1; b) Imagem ponderada em T2; c) Imagem ponderada em DnP	7
2.2	Localização da <i>substantia nigra</i> (a) e <i>locus Coeruleus</i> (b).	12
2.3	Localização da <i>substantia nigra</i> num corte sagital.	13
2.4	IRM com técnicas de RM sensíveis à neuromelanina e técnicas convencionais da SN e LC.	17
2.5	IRM sensíveis à neuromelanina de um indivíduo saudável e um doente com doença de Parkinson.	18
3.1	Interface da ferramenta de segmentação do OsiriX, para introdução do algoritmo desejado e respetivos parâmetros de segmentação.	22
3.2	Representação dos <i>kernels</i> dos filtros do OsiriX em análise. a) Filtro <i>Gaussian Blur</i> ; b) Filtro <i>Smooth</i> ; c) Filtro <i>Low Pass</i> ; d) Filtro <i>Blur</i>	24
3.3	Diferentes resultados de segmentação das áreas de interesse com a variação dos parâmetros do algoritmo <i>Confidence</i> em imagens não filtradas	25
3.4	Diferentes resultados de segmentação das áreas de interesse em imagens sensíveis à neuromelanina filtradas, com a variação dos parâmetros do algoritmo <i>Confidence</i>	26
3.5	Exemplo da aplicação do método de segmentação manual (a) e semiautomática, após filtragem (b) de uma região da SN, realizadas no OsiriX numa imagem sensível à neuromelanina. Resultados da aplicação do método que permite isolar as respetivas áreas de interesse marcadas pelo algoritmo <i>Confidence</i> (c,d).	28
3.6	Segmentação da área da SN com o algoritmo <i>Confidence</i> com parâmetros 2 - multiplicador, 2-iterações, 1- raio em IRM sensíveis à neuromelanina antes (a) e depois (b) da aplicação do método <i>brush closing</i> do OsiriX.	28
3.7	Erros relativos calculados para as regiões hiper-intensas da <i>substantia nigra</i> correspondentes à 1ª fase da avaliação em estudo.	31
3.8	Coeficientes de similaridade de Dice (CSD) calculados para as regiões hiper-intensas da <i>substantia nigra</i> , correspondente à 1ª fase da avaliação em estudo.	31
3.9	Erros relativos calculados para as regiões hiper-intensas da <i>substantia nigra</i> , correspondente à 2ª fase da análise.	33

3.10	Coeficientes de similaridade de Dice (CSD) calculados para as regiões hiper-intensas da <i>substantia nigra</i> , correspondente à 2ª fase da análise.	33
3.11	Erros relativos calculados para as regiões hiper-intensas da <i>substantia nigra</i> , correspondentes à 3ª fase da análise.	34
3.12	Coeficientes de similaridade de Dice (CSD) calculados para as regiões hiper-intensas da <i>substantia nigra</i> , correspondente à 3ª fase da análise.	35
3.13	IRM sensível à neuromelanina, com a localização do segmento de recta coincidente com a fossa cisterna interpeduncular (seta), para marcação do <i>seed point</i> necessário à segmentação da área da <i>substantia nigra</i>	40
3.14	Área das regiões hiper-intensas correspondentes à <i>substantia nigra</i> em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, segmentadas com o procedimento de segmentação OsiriX.	42
3.15	Área das regiões hiper-intensas correspondentes à <i>substantia nigra</i> em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, segmentadas com o procedimento de segmentação MATLAB.	42
3.16	Curvas <i>Receiver operator Characteristic</i> (ROC) das áreas da <i>substantia nigra</i> , segmentadas com o procedimento de segmentação OsiriX, para diferenciar indivíduos saudáveis de doentes com Doença de Parkinson (incluem doentes <i>de novo</i> e com a doença entre 2 a 5 anos).	43
3.17	Curvas <i>Receiver operator Characteristic</i> (ROC) das áreas da <i>substantia nigra</i> , segmentadas com o procedimento de segmentação MATLAB, para diferenciar indivíduos saudáveis de doentes com Doença de Parkinson (incluem doentes <i>de novo</i> e com a doença entre 2 a 5 anos).	44
3.18	Diferenças entre as medições efetuadas pelos procedimentos de segmentação OsiriX e MATLAB em função da média das respetivas medições.	45
4.1	Imagens por ressonância magnética sensíveis à neuromelanina de um indivíduo saudável (Controlo) (a,b), de um doente com DP <i>de novo</i> (c,d), com a doença de 2 a 5 anos de duração (e,f) e <i>late stage</i> (g,h).	51
4.2	Ilustração da posição dos ROIs para o cálculo das razões de contraste da <i>substantia nigra</i> (SN).	52
4.3	Ilustração da posição dos ROIs para o cálculo dos rácios de contraste da <i>substantia nigra</i> (SN).	53
4.4	Área das regiões hiper-intensas correspondentes à <i>substantia nigra</i> (SN) em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina.	57
4.5	Curva <i>receiver operator characteristic</i> (ROC) das áreas da <i>substantia nigra</i> para diferenciar doentes com Doença de Parkinson <i>de novo</i> e doentes com a doença entre 2 a 5 anos de duração.	58
4.6	Curva <i>receiver operator characteristic</i> (ROC) das áreas da <i>substantia nigra</i> para diferenciar doentes com Doença de Parkinson <i>de novo</i> e doentes <i>late stage</i>	58

4.7	Curva <i>receiver operator characteristic</i> (ROC) das áreas da <i>substantia nigra</i> para diferenciar doentes com Doença de Parkinson entre 2 a 5 anos de duração e doentes <i>late stage</i>	59
4.8	Razões de contraste (RC) na região interna dos lados (direito e esquerdo) da <i>substantia nigra</i> (SN).	61
4.9	Razões de contraste (RC) na região lateral, dos lados (direito e esquerdo) da <i>substantia nigra</i> (SN).	61
4.10	Razões de contraste (RC) na região interna da <i>substantia nigra</i> (SN).	63
4.11	Razões de contraste (RC) na região lateral da <i>substantia nigra</i> (SN).	63
4.12	Área da <i>substantia nigra</i> (SN) em função do <i>score</i> total da escala MDS-UPDRS parte III de doentes com Doença de Parkinson <i>de novo</i> , 2 a 5 anos de duração e <i>late stage</i> indisciplinados.	64
4.13	Índice de assimetria clínico avaliado na parte III da escala MDS-UPDRS em função do <i>score</i> de assimetria calculado com base na diferença das áreas dos lados da <i>substantia nigra</i> de doentes com Doença de Parkinson <i>de novo</i> , 2 a 5 anos de duração e <i>late stage</i> indisciplinados.	65
4.14	Fração de volume do mesencéfalo (FVM).	66
4.15	Área da <i>substantia nigra</i> em função da Fração de Volume do Mesencéfalo (FVM) de doentes com Doença de Parkinson <i>de novo</i> , 2 a 5 anos de duração e <i>late stage</i> indisciplinados.	66
4.16	Fração de volume do hipocampo (FVH).	68
4.17	Fração de volume do hipocampo (FVH).	70
4.18	Scores da escala MMSE em função da Fração de Volume de Hipocampo (FVH) de doentes com Doença de Parkinson (DP) <i>late stage</i>	70
A.1	Interface auxiliar (viewDicom) para cálculo do Coeficiente de Similaridade de Dice entre duas imagens DICOM.	83

LISTA DE TABELAS

3.1	Parâmetros dos filtros do OsiriX em análise	24
3.2	Parâmetros de segmentação do algoritmo <i>Confidence</i> da ferramenta do OsiriX em análise.	27
3.3	Protocolo de aquisição da técnica de imagem por ressonância magnética sensível à neuromelanina	27
3.4	Resultados da avaliação (1ªFase) do desempenho dos filtros na segmentação da área da <i>substantia nigra</i>	30
3.5	Resultados da avaliação (2ªFase) do desempenho dos filtros na segmentação da área da <i>substantia nigra</i>	32
3.6	Resultados da avaliação (3ªFase) dos parâmetros no desempenho da segmentação da área da <i>substantia nigra</i>	34
3.7	Dados demográficos dos controlos saudáveis e doentes com Doença de Parkinson (DP).	38
3.8	Resultados da segmentação das áreas da SN recorrendo aos dois procedimentos de segmentação em análise.	41
3.9	Resultados da aplicação do teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni. Significância para <i>p-values</i> inferiores a 0,05. . .	43
3.10	Análise ROC aos valores das áreas medidas com os dois procedimentos de segmentação em estudo para discriminação de indivíduos saudáveis de doentes com Doença de Parkinson.	44
4.1	Dados demográficos dos controlos saudáveis e doentes com Doença de Parkinson (DP) <i>de novo</i> , com a doença entre 2 a 5 anos de duração e <i>late stage</i>	50
4.2	Protocolo de aquisição da técnica de imagem por ressonância magnética TFE utilizada.	50
4.3	Área das regiões hiper-intensas correspondentes à <i>substantia nigra</i> (SN) em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina.	56
4.4	Resultados da aplicação do teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni aos valores das áreas da <i>substantia nigra</i>	57
4.5	Análise ROC aos valores das áreas medidas da <i>substantia nigra</i> para discriminação de doentes com Doença de Parkinson (DP) <i>de novo</i> , doentes com a doença entre 2 a 5 anos de duração e doentes <i>late stage</i>	59

4.6	Resultados da aplicação do estatístico de Wilcoxon aos valores de razão de contraste da região interna e lateral dos dois lados da <i>substantia nigra</i>	60
4.7	Resultados da aplicação do teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni aos valores das razões de contraste na região lateral dos lados direitos e esquerdo da <i>substantia nigra</i>	60
4.8	Razões de contraste (RC) médios da região interna e lateral da <i>substantia nigra</i>	62
4.9	Fração de volume do mesencéfalo (FVM) calculada para indivíduos saudáveis (Controlo) doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP <i>de novo</i>), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes <i>late stage</i>	67
4.10	Resultados da aplicação do teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni aos valores de fração de volume do hipocampo (FVH)	67
4.11	Fração de volume do hipocampo (FVH) calculada para indivíduos saudáveis (Controlo) doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP <i>de novo</i>), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes <i>late stage</i>	68
4.12	Fração de volume do hipocampo (FVH) calculada para indivíduos saudáveis (Controlo) doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP <i>de novo</i>), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes <i>late stage</i> com e sem demência.	69
4.13	Resultados da aplicação do teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni aos valores de fração de volume do hipocampo (FVH)	69

SIGLAS

ANLM *Adaptive Non Local Means.*

CL *Corpos de Lewy.*

CSD *Coeficiente Similaridade de Dice.*

DnP *Densidade protónica.*

DP *Doença de Parkinson.*

DPE *Doença de Parkinson esporádica.*

DP-LS *Doença de Parkinson late stage.*

FID *Free Induction Decay.*

FVH *Fração de Volume do Hipocampo.*

FVM *Fração de Volume do Mesencéfalo.*

FWHM *Full width at half maximum.*

H&Y *Escala de Hoehn & Yahr.*

IRM *Imagem por ressonância magnética.*

IRMf *Imagem por ressonância magnética funcional.*

KW *Kruskal-Wallis.*

LC *Locus coeruleus.*

MDS-UPDRS *Movement Disorder Society - Sponsored Revision of the United Parkinson 's Disease Rating Scale.*

NLM *Non Local Means.*

PET *Positron emission tomography.*

PRI-NLM *Pre-Filtered Rotationally Invariant Non Local Means.*

RC Razão de Contraste.

RF Radiofrequência.

ROI *Region of interest.*

RSR Razão Sinal Ruído.

SGE Sequências *gradient-echo*.

SNc *Substantia nigra pars compacta.*

SNr *Substantia nigra pars reticularis.*

SPE Sequências *spin-echo*.

SPECT *Single-photon emission computed tomography.*

TE Tempo de eco.

TR Tempo de repetição.

TSE *Turbo-spin-echo.*

UPDRS *United Parkinson 's Disease Rating Scale.*

VBM *Voxel Based Morphometry.*

VIE Volume Intracraniano Total Estimado.

INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

A Doença de Parkinson (DP) é uma condição degenerativa que afeta entre 7 a 10 milhões de pessoas em todo o Mundo [1]. Manifesta-se em média aos 55 anos, aumentando significativamente a prevalência com a idade, sendo a doença associada ao envelhecimento mais comum a seguir à Doença de Alzheimer. Os sintomas característicos da DP manifestam-se maioritariamente em fases mais avançadas da doença, sendo por isso necessário investir e continuar a desenvolver métodos de diagnóstico que permitam detetar a doença em estádios iniciais [2].

Os avanços nos métodos de imagem médica possibilitaram o desenvolvimento de outras formas de diagnóstico, apesar deste ainda permanecer maioritariamente clínico. No entanto, estas novas metodologias são essenciais para o diagnóstico precoce e diagnóstico diferencial, na medida em que os sintomas clínicos da DP são comuns a outras patologias.

As técnicas de imagem tiveram e continuam a ter um papel fundamental no estudo da doença e dos seus estádios, o que é fundamental para otimização de tratamentos. As técnicas de *Positron Emission Tomography* (PET) e *Single-photon Emission Computed Tomography* (SPECT) foram bastante utilizadas no estudo da doença, estando a sua evolução bem documentada. No entanto, são técnicas bastante dispendiosas e não estão amplamente distribuídas. Por sua vez, a Imagem por Ressonância Magnética (IRM), tem sofrido uma grande evolução tecnológica, o que tem potenciado a sua utilização no estudo da DP. A IRM é uma técnica acessível, que não utiliza radiação, sendo ideal como meio de diagnóstico e para a realização de estudos evolutivos [3].

Atualmente, existem diversos estudos sobre a DP com recurso à IRM, focando-se sobretudo no diagnóstico diferencial, isto é, na distinção de patologias com sintomas semelhantes. Tem-se dado muita importância à aplicação desta técnica para deteção

precoce da doença, estando os estádios iniciais da doença bem documentados ao nível imagiológico, ao contrário dos estádios avançados e tardios da doença.

Este projeto insere-se numa sequência de dissertações [4–7] relacionadas com a aplicação de técnicas de IRM ao estudo da DP, focando-se em fases iniciais, nomeadamente ao nível da construção de ferramentas de processamento de imagem e otimização de sequências. Deste modo, pretende-se dar continuação às aplicações desenvolvidas anteriormente, para o estudo imagiológico da DP *late stage* (DP-LS) , com especial foco no modo como a concentração da neuromelanina e as alterações volumétricas das estruturas sujeitas a degeneração evoluem em estádios tardios.

Assim pretende-se, com este trabalho, caracterizar os principais aspetos imagiológicos da DP-LS e correlacioná-los com alterações clínicas observadas. Esta caracterização e correlação é fundamental, na medida em que permitirá definir o fenótipo *late stage* e documentar as alterações fisiopatológicas que ocorrem neste estágio, e que poderão eventualmente auxiliar no processo de acompanhamento da doença e na otimização de tratamentos e medicações, a fim de tornar a vida destes doentes melhor.

1.2 Objetivos

Este projeto de dissertação, desenvolvido no Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica (IBEB), tem como principal objetivo caracterizar os principais aspetos imagiológicos da DP-LS. Pretende-se aferir que alterações ocorrem ao nível da concentração de neuromelanina ao longo da progressão da doença, utilizando-se para o efeito uma técnica de IRM sensível a este pigmento. Com recurso às imagens mencionadas, pretende-se utilizar uma ferramenta de segmentação semiautomática, que possibilite uma correta deteção das áreas correspondentes ao sinal hiper-intenso da neuromelanina, otimizando-a e preparando-a para posterior utilização clínica.

Pretende-se comparar os dados recolhidos a partir das imagens com investigações realizadas a estádios iniciais, averiguando o desempenho da ferramenta de segmentação otimizada em comparação com outra ferramenta utilizada num projeto anterior, na capacidade destas conseguirem diferenciar indivíduos saudáveis de doentes com DP. Por outro lado, pretende-se utilizar os dados recolhidos num estudo imagiológico *in vivo* da doença, correlacionando-os com avaliações clínicas observadas. Pretende-se assim encontrar biomarcadores imagiológicos que possibilitem acompanhar os diferentes estádios da doença, auxiliando o processo de diagnóstico e contribuindo para a monitorização da doença, assim como possível análise do impacto da medicação.

1.3 Estrutura da Tese

Esta dissertação está dividida em quatro capítulos para além do presente onde esta descrição se insere, no qual é abordado o contexto em que o trabalho se insere e os objetivos traçados.

No segundo capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre o tema proposto. São apresentados os fundamentos teóricos da IRM e a descrição fisiopatológica da DP. São apresentadas as principais técnicas de imagem utilizadas no diagnóstico e investigação da doença, sendo explicitados em detalhe as utilizadas com recurso à IRM.

O terceiro capítulo está dividido em duas importantes secções. Na primeira secção é apresentada a otimização de uma ferramenta especializada na segmentação das áreas correspondentes ao sinal hiper-intenso da *substantia nigra* (SN). É apresentada a metodologia utilizada para testar diferentes métodos de filtragem e parâmetros de segmentação a fim de se arquitetar o procedimento ideal para a identificação das áreas de interesse. Na segunda parte, é apresentado um estudo de validação, na qual o procedimento otimizado é comparado com um desenvolvido em dissertações anteriores, na capacidade de distinguirem doentes com DP de indivíduos saudáveis.

No quarto capítulo são apresentados estudos imagiológicos incluindo doentes com DP-LS. A ferramenta otimizada é utilizada num estudo imagiológico, cujo objetivo é identificar possíveis biomarcadores que possibilitem caracterizar a evolução da doença. É igualmente apresentado um estudo volumétrico, no qual foram analisadas duas estruturas cerebrais envolvidas na doença.

Por fim, no quinto capítulo, são apresentadas as conclusões finais deste trabalho, assim como sugeridas aplicações futuras.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Imagem por Ressonância Magnética

2.1.1 Princípios Físicos

A imagem por ressonância magnética (IRM) assenta no princípio de ressonância nuclear como base para obter a imagem. O elemento tipicamente utilizado é o hidrogénio, que para além de ser abundante no corpo humano, contém apenas um protão, fator físico de grande importância, tendo em conta que apenas elementos que apresentem spins desemparelhados poderão contribuir para a IRM. O protão possui um spin nuclear, com um momento magnético angular intrínseco. Numa perspetiva clássica, na ausência de um campo magnético externo, a orientação dos spins é aleatória e como tal a magnetização total é nula. No entanto, na presença de um campo magnético externo B_0 os spins alinham-se com a direção do campo, deixando a magnetização total de ser nula. Nesta situação os spins precessam em torno do eixo com a direção do campo externo, com a frequência (ω_0) dada pela expressão $\omega_0 = B_0 \cdot \gamma$, onde γ representa a constante giromagnética, característica do elemento. Numa perspetiva quântica, um protão de hidrogénio imerso num campo magnético externo só pode estar num de dois estados de energia possível – paralelo ao campo (estado de energia mais baixa) ou antiparalelo (estado de maior energia) [8].

Quando é aplicado um impulso de radiofrequência (RF) com a frequência própria de precessão ou de Larmor, o sistema entra em ressonância, absorvendo energia. Deste modo, os spins passam de um estado de menor energia para o de maior energia. Nestas circunstâncias, o vetor de magnetização total passa a precessar em torno do eixo de campo magnético resultante entre a combinação do campo B_0 e o campo B_1 , passando a existir uma componente de magnetização transversal. Quando é cessado o impulso RF, a magnetização transversal volta progressivamente a anular-se, até que permaneça apenas

a componente longitudinal. Ou seja, os spins voltam ao estado de energia de equilíbrio, libertando a energia anteriormente absorvida. O sinal relativo ao decaimento mencionado designa-se de *Free Induction Decay* (FID), decaindo segundo uma constante de tempo $T2^*$. Esta constante é caracterizada pelas interações spin-spin e pelas heterogeneidades do campo B_0 , pela expressão $\frac{1}{T2^*} = \frac{1}{T2} + \frac{1}{T2_{inh}}$. A constante $T2$, característica dos tecidos, corresponde à constante de tempo de relaxação transversal, relacionada com as interações spin-spin. A constante $T1$ que também depende do tecido, corresponde à relaxação longitudinal, relacionada com as interações spin-rede, ou seja, é o tempo compreendido entre o momento em que o pulso RF é cessado até que ocorra novamente o alinhamento total dos spins com o campo B_0 . Por esta razão, o tempo $T1$ é sempre superior ao $T2$ para um dado tecido.

2.1.2 Sequências e formação de imagem

As sequências de impulsos RF são utilizadas com o fim de se produzir o sinal de RM, que por sua vez é utilizado para construir a imagem. Existem duas grandes famílias de sequências: as sequências *spin-echo* (SPE) e as sequências *gradient-echo* (SGE).

2.1.2.1 Sequências Spin-Echo

As SPE são caracterizadas pela aplicação de um impulso RF de 90° , que provoca o efeito de ressonância já explicado e posteriormente um impulso de 180° , que vai provocar o refasamento dos spins. Deste modo, é possível compensar o efeito das heterogeneidades do campo e obter um sinal ponderado em $T2$. No processo de formação da imagem, as várias contribuições dos spins consoante as suas localizações no plano são obtidas à custa de três gradientes de campo – para seleção do plano, codificação em fase e frequência. O sinal de RM que vai sendo medido permite preencher o chamado espaço-K, onde são guardadas as componentes correspondentes às várias frequências espaciais da imagem. Para a sua obtenção é posteriormente aplicada a transformada inversa de Fourier [8]. O tempo entre a aplicação do impulso de 90° e a formação do eco designa-se de tempo de eco (TE). O tempo entre um impulso de 90° e o impulso de 90° seguinte, designa-se de tempo de repetição (TR). No caso das SPE é preenchida uma linha do espaço-K a cada repetição.

2.1.2.2 Sequências Gradient-Echo

As SGE são caracterizadas pela aplicação de apenas impulsos de excitação. Para obtenção do eco é aplicado um primeiro gradiente de desfasagem, seguido de um gradiente de refasagem. Neste tipo de sequências é usual utilizar ângulos inferiores a 90° , o que permite reduzir a quantidade de magnetização que é colocada no plano transversal. Desta forma, ocorre uma recuperação da magnetização longitudinal mais rápida, o que possibilita a utilização de TR e TE menores e consequentemente uma redução do tempo de aquisição [8].

2.1.3 Imagens Ponderadas

Uma das características mais interessantes da IRM é que o contraste entre os vários tecidos que se pretendem visualizar depende dos parâmetros de aquisição, isto é, do TR e do TE aplicados. Manipulando os parâmetros de aquisição pode-se assim ponderar a imagem em T1, T2 ou em densidade protónica (DnP). Numa ponderação em T1 pretende-se que o sinal reflita essencialmente as diferenças entre os valores de T1 dos vários tecidos, minimizando o efeito das restantes características que lhes estão inerentes, como o T2 e DnP. Utilizando TR curtos, permite-se que as diferenças entre as relaxações longitudinais dos tecidos sejam destacadas. Por sua vez, o TE está relacionado com o tempo de relaxação transversal. Numa ponderação T1 pretende-se minimizar a influência do T2, utilizando-se para o efeito TE curtos (Figura 2.1- a)). Numa ponderação T2 utilizam-se TR longos, para minimizar a influência do T1, garantindo que a relaxação longitudinal é completa, e para destacar o efeito de diferentes T2, utilizam-se TE longos (Figura 2.1- b)). Se forem utilizados TR longos e TE curtos, minimiza-se a influência dos T1 e T2 dos vários tecidos, estando o contraste dependente apenas da DnP (Figura 2.1- c)) [9]. Em IRM cerebrais, consoante a ponderação visualizamos a substância branca, a substância cinzenta e o líquido cefalorraquidiano com intensidades distintas, devido aos T1, T2 e número de prótons que são característicos de cada estrutura (Figura 2.1).

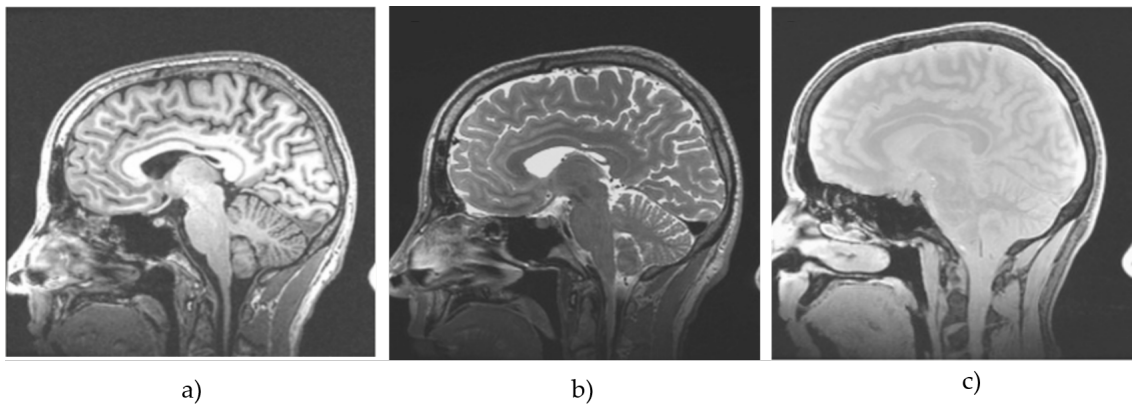


Figura 2.1: IRM ao cérebro, plano sagital. a) Imagem ponderada em T1; b) Imagem ponderada em T2; c) Imagem ponderada em DnP (Adaptado de [10])

2.2 Processamento de imagem

2.2.1 Segmentação de imagem

A segmentação é o processo na qual uma imagem é particionada em diversos segmentos, de modo a simplificar a representação dessa imagem em algo passível de ter um significado acrescido para análise. É utilizada para extrair características presentes na imagem, como objetos ou simples fronteiras entre regiões. Nesse processo, a cada píxel

da imagem é atribuído uma etiqueta, na qual os píxeis que partilhem de uma mesma etiqueta partilham pelo menos uma característica.

Na imagem médica, usualmente, os métodos de segmentação são utilizados para isolar diferentes regiões anatómicas, de modo a serem medidas áreas e volumes de estruturas, ou identificação de anomalias. Não existe nenhum algoritmo de segmentação ideal para a generalidade das técnicas de imagem médica. O sucesso da segmentação está dependente de uma escolha cuidada do algoritmo e das suas especificações em função das características da região que se pretende segmentar.

Uma família de algoritmos bastante utilizada é a *Region Growing*.

2.2.1.1 *Region Growing*

Os algoritmos de *Region Growing* necessitam de um *seed point* ou *seed region*, isto é, um píxel ou um conjunto de píxeis iniciais contidos na região que se pretende segmentar. Os píxeis vizinhos são posteriormente avaliados pelo algoritmo para determinar se devem ou não ser incluídos nessa região inicial. O processo continua até que não sejam adicionados mais píxeis. Os algoritmos que pertencem a esta família de segmentação diferenciam-se pelos critérios de inclusão utilizados e pelo modo como os píxeis vizinhos são visitados.

Confidence

O algoritmo *Confidence* utiliza simples operações estatísticas nas regiões que vão sendo identificadas como critério de inclusão. São calculados a média e o desvio padrão das intensidades de todos os píxeis incluídos na região identificada. O utilizador fornece um valor, designado de multiplicador, que é multiplicado pelo desvio padrão, sendo definido assim um intervalo em torno da média. Os píxeis vizinhos que estejam dentro desse intervalo são incluídos na região. A equação 2.1, representa o critério de inclusão deste método de segmentação,

$$I(X) \in [m - f\sigma, m + f\sigma] \quad (2.1)$$

Onde m , f e σ representam a média, o fator de multiplicação e o desvio padrão, respetivamente.

Quando mais nenhum píxel é incluído na região termina a iteração. Posteriormente, os valores de média e desvio padrão são recalculados e uma nova análise aos píxeis vizinhos é efetuada. O algoritmo termina quando mais nenhum píxel é adicionado à região ou quando o número de iterações escolhido é atingido [11].

Threshold

O método de segmentação *Threshold* utiliza como critério de inclusão para o crescimento de região um intervalo de intensidades pré-estabelecido. São incluídos os píxeis caso a sua intensidade esteja incluída no intervalo. A equação 2.2, ilustra o critério de crescimento de região deste algoritmo,

$$I(X) \in [min, max] \quad (2.2)$$

Onde *min* e *max*, correspondem respetivamente aos valores mínimos e máximos do intervalo pretendido [11].

Neighbourhood

O algoritmo *Neighborhood* tal como o anterior, necessita de um intervalo de intensidades como critério de inclusão, com a variante de que analisa uma vizinhança de píxeis fornecida, mantendo o píxel original na região caso as intensidades de todos os píxeis vizinhos incluídos na análise estejam contidas no intervalo dado [11].

2.2.2 Métodos de filtragem

Na técnica de IRM a razão sinal ruído (**RSR**), parâmetro que avalia o nível de ruído presente nas imagens, é bastante influenciada pelos parâmetros de aquisição selecionados (Equação 2.3).

$$RSR = K \times (Volume\ do\ Voxel) \times \sqrt{\frac{Número\ de\ medições}{Largura\ de\ Banda}} \quad (2.3)$$

Na equação 2.3, *K* corresponde a uma constante que engloba fatores dependentes do *hardware* de aquisição, intensidade de campo e dos tecidos analisados. A RSR é proporcional à resolução espacial da imagem e é influenciada pelo tempo de aquisição. Para se visualizarem determinadas estruturas anatómicas, é por vezes necessário diminuir as dimensões dos vóxeis da imagem, o que consequentemente se traduz numa diminuição da RSR, que condiciona o processamento das imagens, como a segmentação. Para se minimizar o efeito do ruído nas imagens é comum recorrer-se a métodos de filtragem no pré-processamento das mesmas.

Neste trabalho, numa fase inicial é estudada a influência da aplicação de diferentes filtros no desempenho da segmentação da SN. Assim sendo, de seguida são apresentadas breves descrições teóricas dos filtros testados, mencionados segundo a denominação atribuída pelos *softwares* e algoritmos utilizados.

2.2.2.1 *Gaussian Blur*

O filtro *Gaussian Blur* é tipicamente utilizado para reduzir ruído e preparar a imagem para segmentação. Utiliza uma função gaussiana para calcular a transformada a aplicar em cada píxel da imagem. Ou seja, são utilizados valores de uma distribuição gaussiana para construir uma matriz de convolução, que depois é aplicada à imagem. No processo de convolução, o píxel original recebe o maior peso, sendo que os píxeis vizinhos contidos dentro do *kernel* vão recebendo pesos menores à medida que a distância ao píxel original aumenta.

2.2.2.2 *Blur*

O filtro *Blur* é um filtro que esbate a imagem, sobretudo nos contornos ou fronteiras entre regiões. O procedimento é idêntico ao descrito anteriormente, com a exceção que as ponderações impostas pelo *kernel* não são oriundas de uma função gaussiana. Usualmente aplica-se ao píxel central a soma do valor deste com os seus vizinhos e divide-se esse resultado por um número superior ao total de elementos constituintes do *kernel*.

2.2.2.3 *Low Pass e Smooth*

Filtros *Low Pass* removem as altas frequências, que numa imagem se traduz nos detalhes ou contornos entre diferentes regiões. Áreas nas imagens com valores constantes de intensidades não são alteradas por estes filtros. Todas as implementações de filtros em que são aplicados *kernels* de média, ou seja, em que o píxel central recebe o valor da média dos seus vizinhos, são filtros *Low Pass*. Os filtros descritos anteriormente pertencem à família dos *Low Pass*. Na imagem o efeito produzido por filtros desta família é o de *smoothing*, isto é, de esbatimento da imagem. Existem diversos algoritmos de *smoothing*, sendo um dos mais usuais o filtro de Mediana, no qual é selecionado o valor mediano dos contidos dentro do *kernel*, para substituir o píxel central.

2.2.2.4 *Edge-preserving smoothing*

O *Edge-preserving smoothing* é um filtro que permite esbater as texturas procurando preservar as fronteiras entre regiões. Um dos algoritmos que permite aplicar uma filtração com as características mencionadas, consiste em percorrer a imagem com um *kernel* cujo os coeficientes vão sendo adaptados consoante as intensidades dos píxeis que estão em análise. Se o *kernel* for de 3×3 píxeis, são recolhidas as distâncias de intensidades dos 8 vizinhos ao píxel central, normalizadas entre 0 e 1. Os coeficientes são calculados através da equação 2.4.

$$C_i = (1 - d_i)^p \quad (2.4)$$

Na equação 2.4, C_i corresponde ao coeficiente do elemento i do *kernel*, d_i corresponde à distância de intensidades entre o píxel central e o vizinho i e p corresponde a um fator

que controla o poder do esbatimento. Nos píxeis fronteiros de um objeto, as distâncias de intensidades são maiores para os píxeis que não pertencem ao objeto, tendo por sua vez um efeito menor na intensidade final do píxel central. Com base neste princípio, as fronteiras são menos afetadas [12].

2.2.2.5 *Pre-Filtered Rotationally Invariant Non Local Means filter (PRI-NLM)*

O filtro de médias não local (NLM, do inglês *Non Local Means*) tem vindo a ser bastante utilizado no pré-processamento de imagem médica, na medida em que se propõe a remover o ruído da imagem sem comprometer os seus detalhes. Assenta no princípio que vóxeis com vizinhanças semelhantes tendem a ser idênticos ao seu valor original isento de ruído. A redução de ruído é conseguida efetuando médias de vóxeis que originalmente tinham a mesma intensidade na imagem isenta de ruído. Calcula médias ponderadas da intensidade dos vóxeis numa vizinhança, atribuindo ao vóxel em análise o seu valor multiplicado pela ponderação obtida. No entanto, este método é limitado, na medida em que apenas identifica vizinhanças que partilhem a mesma estrutura e orientação, traduzindo-se numa atribuição de pesos reduzidos a conjuntos de vóxeis com estruturas semelhantes mas orientações distintas.

O filtro *Pre-Filtered Rotationally Invariant Non Local Means filter (PRI-NLM)* é um filtro adaptado que utiliza a colaboração de duas propriedades: a da redundância de padrões presentes na imagem (princípio do filtro NLM) e da habilidade da imagem poder ser representada por um pequeno número de funções de base. Esta técnica adapta o comum método NLM eliminando as suas limitações, ao avaliar semelhanças com um processo rotacionalmente invariante. A avaliação das semelhanças deixa de utilizar o valor médio da região em torno do vóxel, passando a ser específica de um ponto em vez da região. Esta alteração tem a atenuante de não ser tão robusta contra o ruído, havendo a necessidade de pré-filtrar a imagem. Para tal, o algoritmo utiliza inicialmente um filtro ODCT (*Oracle-based Discrete Cossene Transformation*), no qual são utilizados blocos de coeficientes sobre a imagem para obter estimativas da intensidade original de cada vóxel sem ruído. Comprovou-se que as duas abordagens implementadas numa única técnica obtêm melhores resultados que aplicadas isoladamente [13].

2.2.2.6 *Adaptive Non Linear Mean filter (ANLM)*

O filtro *Adaptive Non Linear Mean filter (ANLM)* é uma adaptação do filtro NLM que tem em consideração a natureza Rician de dados de RM e a variação espacial do ruído. O parâmetro mais importante do NLM é h^2 , que regula a força do esbatimento. O valor ótimo experimentalmente estimado é σ^2 , sendo σ o desvio padrão do ruído. No entanto, a utilização de uma variância global de ruído em toda a imagem conduz a resultados não ideais quando se lida com ruído não estacionário. Este método adaptativo introduz a estimativa de ruído local. A estimativa calculada tem por base a distância euclidiana mínima entre dois volumes, cada um calculado pela subtração do volume original pelo

mesmo volume filtrado por um filtro *low pass*. Este método apresenta a vantagem de identificar regiões com a mesma estrutura, mas com médias de intensidades diferentes, compensando heterogeneidades de intensidades tipicamente presentes em imagens de RM. Por outro lado, minimiza a sobrestimação da variância do ruído em casos extremos [14].

2.3 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa do sistema nervoso central, caracterizada por perda neuronal na porção *pars compacta* da *substantia nigra* (SNc) (Figura 2.2 - a), 2.3). Esta perda neuronal conduz a uma diminuição de dopamina no corpo estriado, causando disfunção no sistema de controlo motor. Outra característica da DP é a degeneração do locus coeruleus (LC) (Figura 2.2- b)), que resulta numa diminuição da concentração da norepinefrina no córtex frontal, no hipotálamo e outras regiões cerebrais [2].

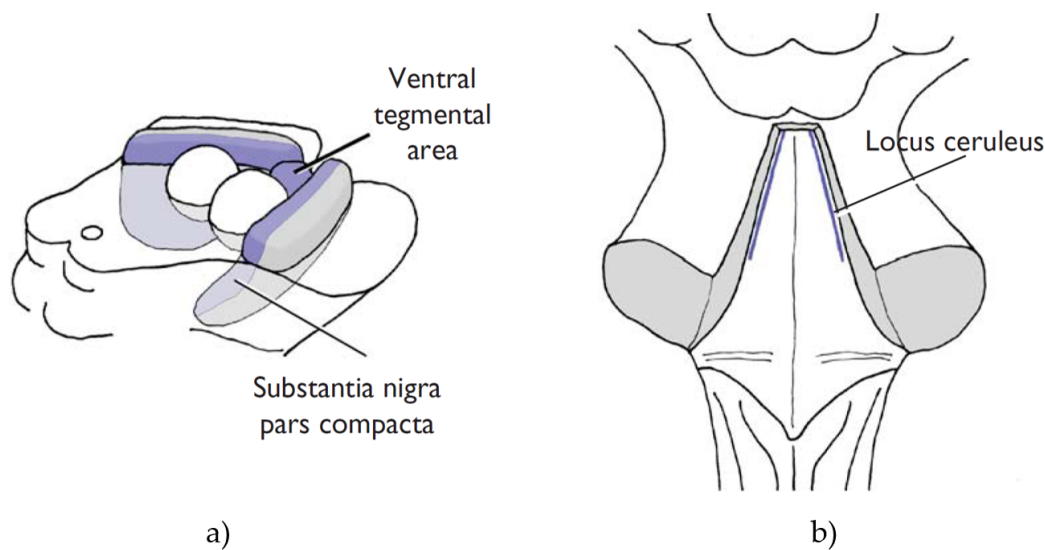


Figura 2.2: Localização da *substantia nigra* (a) e *locus Coeruleus* (b) (adaptado de [15]).

Associado à DP está o aparecimento de corpos de Lewy (CL), agregados anormais de proteínas em células nervosas. Estudos patológicos demonstram que a localização destes agregados está associada à progressão da doença, tendo sido desenvolvida uma escala de estádios denominada de *Braak Staging*, composta por seis estádios sequenciais [17].

Clinicamente, a DP é caracterizada pela variada combinação de sintomas, tais como tremor em repouso, rigidez, bradicinesia (lentidão nos movimentos), hipocinesia (diminuição na amplitude dos movimentos), instabilidade postural, entre outros. Para além de disfuncionalidades motoras, é comum estarem associadas à DP condições de depressão, demência e problemas cognitivos. Tipicamente, a doença tem um pico de incidência aos

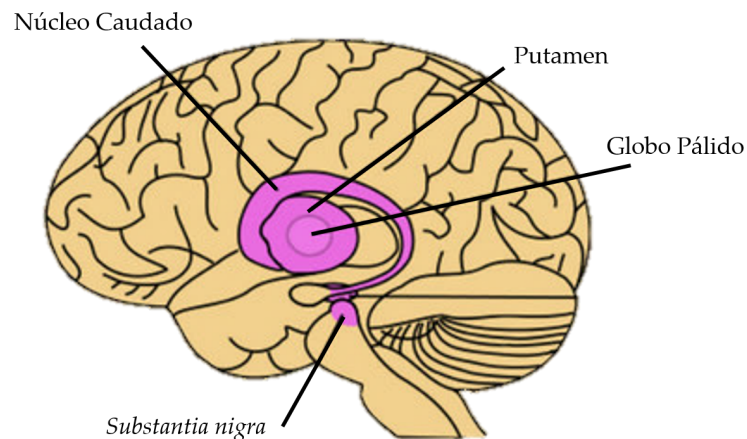


Figura 2.3: Localização da *substantia nigra* num corte sagital (adaptado de [16])

55 anos, aumentando consideravelmente a incidência de 20/100.000 para 120/100.000 aos 70 anos de idade. Aproximadamente 95% dos casos de DP são idiopáticos, ou designados de Doença de Parkinson esporádica (DPE), sendo que os restantes 5% são de origem hereditária [2].

Na DPE, os primeiros sintomas manifestam-se usualmente após a doença estar num estado considerado avançado [17]. Através de estudos *post-mortem*, está demonstrado que terá ocorrido a perda de pelo menos 50% das células da SNc antes de surgirem os primeiros sintomas motores da doença [18]. A escala de Hoehn & Yahr (H&Y) é bastante utilizada para classificar pacientes com DP com base nos sintomas que apresentam. É constituída por 5 estádios, tendo-lhe sido, desde o momento em que foi proposta, acrescentados graus intermédios [19, 20].

Existem diversos modelos que sugerem quais poderão ser as causas que estão na base do aparecimento da DPE. No entanto, ainda não existe consenso geral de qual ou quais serão as principais. Destes modelos, destacam-se os que apontam como causa de degeneração a presença de toxinas, infeções, disfunção mitocondrial e stress oxidativo [2], [21]. Acredita-se que a DP resulta provavelmente da conjugação de múltiplos fatores, que incluem o envelhecimento, suscetibilidade genética e exposições ambientais [21].

2.3.1 Doença de Parkinson *late stage*

Existem até ao momento poucos estudos relacionados com a Doença de Parkinson *late stage* (DP-LS). Para uma caracterização correta dos estádios mais tardios da doença, é necessário existirem informações clínicas muito precisas, devido essencialmente aos tratamentos a que estão sujeitos os pacientes.

Antes de se utilizar a levodopa (substituto para a dopamina [22]) como tratamento, estádios avançados da escala H&Y eram caracterizados por frequentes e severas disfunções cognitivas e motoras. Quando a levodopa e a estimulação cerebral profunda começaram

a serem utilizadas como meios de tratamento, diversos estudos apontavam para um aumento nos problemas de sono e de disfunções autonómicas e cognitivas com o progresso da doença [23]. No entanto, ainda é bastante controverso se os problemas que se agravam são devido aos tratamentos em si ou à própria progressão da doença. Para além do agravamento de sintomas mencionado, a DP-LS está associada ao aparecimento de discinésias (movimentos involuntários anormais) e flutuações motoras (oscilações do desempenho motor). Um estudo efetuado sugere que a prevalência de flutuações motoras é ditada pela progressão da doença e dose de tratamento, enquanto que a prevalência de discinésias é ditada pela duração dos tratamentos [24].

Alguns autores sugerem que o fenótipo da doença se alterou nos últimos 30 anos, havendo diferenças entre a doença em estádios avançados, caracterizada pelas complicações motoras induzidas pela levodopa, e estádios tardios. Sugerem que a DP-LS é dominada pela presença de sintomas não-motores, como disfunções cognitivas, psicose, depressão, disfunções autonómicas, sono durante o dia e sintomas axiais, traduzindo-se em perda de independência e frequente institucionalização [25].

A resposta ao tratamento de levodopa não só é utilizada como critério adicional de diagnóstico da DP, como dá informação sobre a progressão e o fenótipo clínico da doença [26]. No entanto, pouco se sabe se alterações imagiológicas poderão ajudar a distinguir os estados avançados dos tardios, muito devido à debilidade que os doentes nesses estádios apresentam e da recente alteração fenotípica registada [27].

2.3.2 Neuromelanina

A neuromelanina é um pigmento escuro que se encontra em células neuronais da SNc e LC. Acredita-se que a neuromelanina tem um papel fundamental na proteção dos neurónios dopaminérgicos contra metais redox ativos, metais tóxicos e compostos orgânicos tóxicos. É um produto do metabolismo da dopamina e da norepinefrina, por vias enzimáticas e não-enzimáticas [28].

Vários estudos defendem que a concentração deste pigmento está intrinsecamente relacionada com a DP, na medida em que tem um papel fundamental contra o stress oxidativo, o qual está apontando como sendo uma provável causa da doença [21, 29]. A concentração de neuromelanina aumenta normalmente nos neurónios da SN com a idade até sensivelmente aos 60 anos, idade a partir da qual diminui devido à perda neuronal natural associada ao envelhecimento. Em doentes com DP, a concentração de neuromelanina na SNc chega a ser 50% menor que em indivíduos saudáveis com a mesma idade. A diminuição da concentração de neuromelanina é consistente com a perda neuronal associada ao Parkinson [28]. Apesar de existirem vários estudos que demonstram que a concentração de neuromelanina diminui em doentes com DP em estádios iniciais, pouco se sabe sobre como varia esta concentração no decorrer da doença, sobretudo em doentes *late stage*.

2.4 Técnicas de Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico da doença é maioritariamente clínico, baseado nos sintomas anteriormente descritos. De forma a classificar o estado e a severidade da doença foi criada a escala *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS), que teve como base a incorporação e unificação de várias escalas de diagnóstico na forma de um protocolo internacional de classificação e avaliação do estado da doença [30].

Avanços na imagem médica estrutural e funcional permitiram melhorar e otimizar o diagnóstico diferencial [3]. De facto, a DP partilha diversos sintomas com síndromes rígido-acinéticos, assim como com outras doenças do foro neurológico. Estudos recentes sobre a patologia da DP, elucidam para a importância do diagnóstico precoce da doença e para a urgência na identificação de biomarcadores que permitam avaliar o estado e o resultado dos tratamentos. Os métodos de imagem têm cada vez mais importância na identificação e avaliação de tais biomarcadores para a deteção da doença em estádios primários e para estudo da sua progressão.

Na DP os métodos de imagem mais utilizados são o PET, SPECT e a IRM.

2.4.1 Técnicas de PET e SPECT aplicadas à Doença de Parkinson

As técnicas de PET e SPECT são bastante utilizadas para a avaliação da função dopaminérgica. Permitem igualmente estudar e avaliar o fluxo sanguíneo cerebral e o metabolismo de glucose. São úteis para estudar padrões da conectividade funcional em repouso e alterações na ativação durante tarefas motoras e comportamentais. De facto, a DP está associada a um aumento do metabolismo de glucose, do fluxo cerebral nos núcleos da base e no cerebelo e à sua redução em várias áreas do córtex cerebral, padrão designado de *Parkinson's Disease Related Pattern* (PDRP) [3]. Estudos prévios comprovam o sucesso da técnica de PET utilizando o radiofármaco $[^{18}\text{F}]\text{-fluorodeoxyglucose}$ (FDG) na diferenciação da DP idiopática de outras doenças características de Parkinsonismo clínico [31]. Estas técnicas são bastante utilizadas em estudos da DP, essencialmente por serem ideais para estudar funções moleculares e neuro-químicas, mas pelas razões já expostas, menos aplicáveis que a IRM.

2.4.2 Técnicas de IRM aplicadas à Doença de Parkinson

Enquanto as técnicas de PET e SPECT permitem avaliar a atividade metabólica cerebral ou a atividade pré- e pós-sináptica de acordo com o marcador utilizado, a IRM, em especial a funcional (IRMf), permite avaliar indiretamente a atividade cerebral sendo sensível à concentração relativa de hemoglobina oxigenada/desoxigenada. A IRM é uma das técnicas de imagem médica com maior desenvolvimento nos últimos anos, tendo diversas aplicações importantes na confirmação de diagnóstico da DP e no estudo da sua progressão. As técnicas de PET e SPECT são bastante dispendiosas e não estão amplamente distribuídas. A técnica IRM apresenta a vantagem de não usar radiação ionizante

como meio para formar a imagem, está disponível amplamente e é capaz de produzir imagens com excelente resolução espacial e com uma razoável resolução temporal [3].

2.4.2.1 Imagens Sensíveis à neuromelanina

Diversas técnicas convencionais de IRM falharam no objetivo de permitir visualizar diretamente a SNc e o LC, muito devido às suas reduzidas dimensões e à pequena diferença de contraste conseguida. Recentemente, surgiram novas técnicas que avaliam indiretamente a degeneração destas estruturas através da medição da neuromelanina nelas presente [15, 32]. A neuromelanina é um pigmento com propriedades paramagnéticas, característica que se traduz num sinal elevado em ponderações T1, sendo passível de ser identificada e quantificada *in vivo*. Recentemente, começaram a ser utilizadas técnicas que utilizam esta propriedade, tendo sido reportado sucesso na visualização dos núcleos contendo neuromelanina da SNc e LC. Para tal, foi sugerida a utilização de equipamento com 3 Tesla (3-T) e sequências de *fast spin-echo* (FSE) com parâmetros de aquisição que permitem ponderar a imagem em T1 [33].

Em imagens de RM sensíveis à neuromelanina é possível visualizar bandas com sinal de intensidade elevada na porção medial posterior do pedúnculo cerebral em relação ao nível do mesencéfalo (Figura 2.4). Pensa-se que esta distribuição reflete a presença de neurónios dopaminérgicos, que contêm pigmentos de neuromelanina, na SNc (Figura 2.4 - b)). A técnica convencional de Spin-echo (SE) ponderada em T1 praticamente não mostra qualquer contraste nas zonas referidas (Figura 2.4 - c)). Também em imagens ponderadas em T2, a região da SN apresenta sinal de baixa intensidade e pouco contrastada, devido essencialmente a deposições fisiológicas de ferro local (Figura 2.4 - d)). Em imagens ponderadas em DnP, a região da SN pode ser identificada como sinal proveniente da substância cinzenta, mas não é possível discriminar a SNc da *substantia nigra pars reticularis* (SNr) (Figura 2.4 - e)). Deste modo, a técnica de imagem de RM sensível à neuromelanina é considerada única para a visualização direta da SNc, essencial para monitorização da DPE [33].

Tipicamente, para obter imagens sensíveis à neuromelanina é utilizada a técnica de turbo-spin-echo (TSE) com uma preparação de transferência de magnetização para observar contraste nas estruturas que contêm neuromelanina, como a SN e LC. Recentemente foi mostrado que a técnica de SGE com preparação de transferência de magnetização também pode ser utilizada para observar em simultâneo a SN e LC. Acredita-se que o sucesso na visualização das estruturas que contêm a neuromelanina está precisamente na utilização de um número elevado de impulsos RF, que resulta no efeito de transferência de magnetização. Razão pela qual a técnica convencional de SE ponderada em T1 não permite visualizar a neuromelanina, uma vez que não ocorre o efeito mencionado [34].

Diversos estudos comprovam que a técnica IRM sensível à neuromelanina facilita a deteção de alterações patológicas degenerativas relacionadas com os neurónios dopaminérgicos que contêm o pigmento, como a DP e alterações funcionais em distúrbios

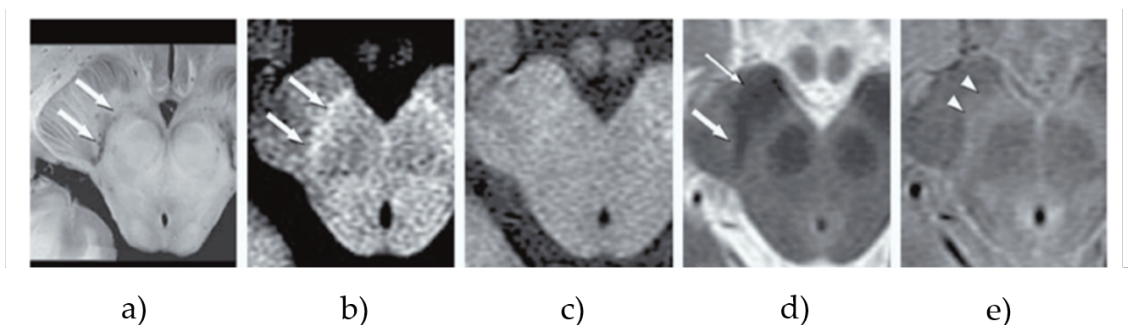


Figura 2.4: IRM com técnicas de RM sensíveis à neuromelanina e técnicas convencionais da SN e LC. a) espécime macroscópica. b) IRM sensível à neuromelanina. c) Imagem ponderada em T1. d) Imagem ponderada em T2. e) Imagem ponderada em DnP. Nas imagens sensíveis à neuromelanina são observadas zonas de hiperintensidade na localização correspondente à SN (a,b; setas). Na imagem ponderada em T2 as regiões da SN (d; seta grande) e as fibras pedunculares (d; seta pequena) aparecem com baixa intensidade. Na imagem DnP a região da SN aparece como sinal da substância cinzenta (e; cabeça de seta) (adaptado de [37]).

psiquiátricos. No caso específico da DP, esta técnica permite visualizar uma significativa redução de sinal nas regiões de SNc e LC de doentes, refletindo a diminuição do número de neurónios e de neuromelanina intracelular nesses núcleos (Figura 2.5) [33, 35].

Recentemente, a técnica de IRM sensível à neuromelanina foi aplicada a doentes com DP *de novo* não tratados, utilizando-se para tal avaliação um método de análise semi-automático. Foi demonstrado que a técnica pode discriminar doentes com DP de controlos saudáveis com elevada sensibilidade e especificidade [36]. Não existem até ao momento estudos que apliquem a técnica descrita a doentes com DP-LS, pensando-se que poderá ser útil no estudo da progressão da doença. No entanto, apesar das vantagens referidas relativamente à deteção de alterações na SNc e LC na DP, a técnica apresenta longos tempos de aquisição e uma resolução relativamente baixa [33, 36].

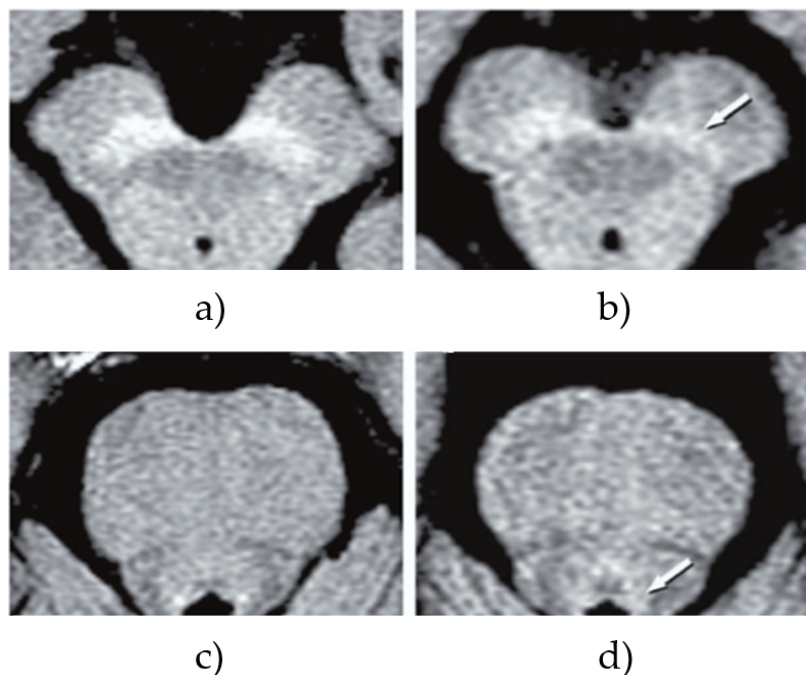


Figura 2.5: IRM sensíveis à neuromelanina de um indivíduo saudável e de um doente com Doença de Parkinson (DP). a) - c) Mulher de 68 anos saudável. b) - d) Homem de 70 anos com DP. As zonas da SN (b; seta) e LC (d; seta) aparecem com menor intensidade de sinal em doentes com DP (adaptado de [37]).

2.4.2.2 Estudos morfológicos e volumétricos

A técnica de IRM tem sido bastante utilizada em análises volumétricas ao cérebro, para as quais imagens estruturais 3D são utilizadas para quantificar alterações volumétricas e morfológicas de estruturas anatómicas envolvidas nas doenças neurológicas. No caso específico da DP tem-se procurado averiguar se essas análises possibilitam auxiliar no diagnóstico diferencial da doença. Alguns estudos apontam para que estruturas como o córtex cerebral, putamen e a protuberância possibilitam diferenciar diferentes síndromes parkinsonianas da DP idiopática [37–39]. Outros estudos, que recorrem à técnica de *Voxel Based Morphometry* (VBM), permitiram a visualização de perdas de substância cinzenta em áreas corticais frontais na DP. A VBM é bastante utilizada no estudo de padrões de atrofia, permitindo a diferenciação da DP sem e com demência, sugerindo que ocorre atrofia cerebral em diferentes regiões cerebrais [40, 41].

Num estudo volumétrico realizado em doentes com e sem demência em estádios iniciais, foram observadas reduções nos volumes do hipocampo e da amígdala, verificando-se apenas diferenças estatisticamente significativas entre controlos e doentes com demência, consistentes com estudos *post mortem* efetuados. Os autores sugerem a possibilidade de ocorrer redução dos volumes das estruturas mencionadas ao longo da progressão da

doença [42]. Outros estudos realizados reportaram a ocorrência de atrofia no hipocampo em doentes com e sem demência, verificando uma redução mais acentuada nos casos com demência, comparável à redução que se verifica na Doença de Alzheimer [43, 44]. Especificamente, num estudo realizado com doentes não medicados em estádios iniciais, foi reportada a existência de atrofia no hipocampo e no córtex pré-frontal, sugerindo que os défices de memória verificados estão relacionados com a atrofia no hipocampo e a diminuição de tempo de reação está relacionada com a atrofia no córtex pré-frontal, ambos sintomas comuns da DP [45].

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE SEGMENTAÇÃO

Um dos objetivos desta dissertação é a quantificação da neuromelanina em imagens por ressonância magnética (IRM) de doentes com Doença de Parkinson (DP). Deste modo, pretende-se utilizar uma ferramenta de segmentação semiautomática que permita aferir a área correspondente ao sinal hiper-intenso associado à presença de neuromelanina em imagens sensíveis a este pigmento, como explicado na secção 2.4.2.1. Neste capítulo, numa primeira parte, são apresentadas as ferramentas e a metodologia utilizada para otimizar os seus parâmetros. Na segunda parte é apresentado um estudo comparativo da ferramenta otimizada com outra implementada em projetos de dissertação anteriores [4, 5], relativamente à sua capacidade de distinguir doentes com DP de indivíduos saudáveis.

3.1 Otimização da ferramenta de segmentação do OsiriX para quantificação da neuromelanina

Com o objetivo de estabelecer um procedimento de segmentação semiautomático otimizado para a correta identificação da área da *substantia nigra* (SN), foi testada a influência da aplicação de filtros e da variação dos parâmetros da ferramenta utilizada no processo de segmentação. Nesta secção são apresentados a metodologia utilizada e os resultados dos testes efetuados, para se definir um procedimento de segmentação a utilizar para a identificação e medição das áreas de interesse para o estudo da DP no presente trabalho e em estudos subsequentes.

3.1.1 Materiais e métodos

3.1.1.1 OsiriX

O OsiriX (Versão Lite 7.5.1, Pixmeo, Genebra, Suíça) é um programa que junta funcionalidades de visualização de imagem médica com métodos de processamento. Corre apenas em OSX (Apple Inc., Califórnia, EUA) e complementa a grande maioria dos visualizadores ao suportar uma arquitetura de *plug-ins*, que permite ao utilizador expandir as funcionalidades da aplicação para o que desejar. Apresenta a grande vantagem de ser compatível com os mais variados sistemas hospitalares, sendo um programa simples e intuitivo para utilização médica.

Ferramenta de segmentação do OsiriX

O OsiriX tem uma ferramenta de segmentação semiautomática 2D/3D, estando disponíveis três algoritmos de segmentação: *Threshold*, *Neighborhood* e *Confidence*. Num projeto de dissertação anterior [6] foi avaliado o potencial desta ferramenta, tendo sido comparados estes algoritmos no processo de segmentação da área correspondente à neuromelania. Nesse estudo foi realizada uma análise qualitativa às imagens, tendo sido concluído que o método *Confidence* era o mais eficiente dos disponíveis (Figura 3.1). No entanto, foi realçada a importância e a necessidade da variação dos parâmetros de segmentação que o método utiliza.

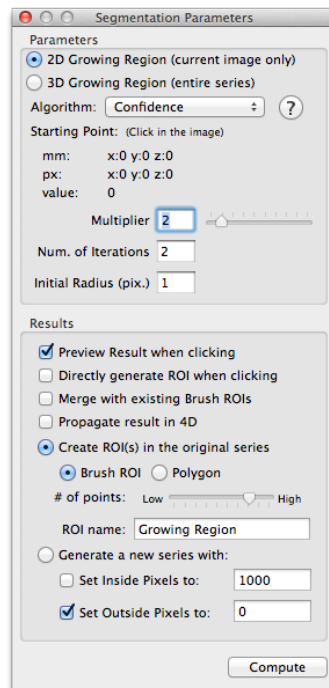


Figura 3.1: Interface da ferramenta de segmentação do OsiriX, para introdução do algoritmo desejado e respetivos parâmetros de segmentação. Neste exemplo específico, estão selecionados o algoritmo *Confidence* com os parâmetros 2 - Multiplicador, 2 - N° de Iterações e 1 - Raio Inicial.

3.1.1.2 Filtros em estudo

As imagens de RM podem apresentar ruído que afeta bastante a eficiência da segmentação, que por sua vez está dependente do contraste da imagem. No caso específico das imagens sensíveis à neuromelanina, foi verificada a necessidade de incluir a filtragem no pré-processamento.

O OsiriX tem disponível um conjunto de filtros que podem ser aplicados pelo utilizador. Por questões de simplificação do procedimento a seguir, seria conveniente utilizar um destes filtros, uma vez que estão implementados no mesmo ambiente que a ferramenta de segmentação. Para a remoção de ruído podem ser utilizados o *Gaussian Blur*, *Blur*, *Low Pass* e o *Smooth*. Uma vez que trabalhos anteriores [5, 36] sugeriram que haveria vantagem em utilizar outro tipo de filtros, como o *Adaptive Non Local Means Filter* (ANLM), o *Pre-Filtered Rotationally Invariant Non Local Means* (PR-NLM) e o *Edge preserving smoothing*, resolveu-se verificar se valeria a pena implementar um *plug-in* que permitisse aplicar um destes filtros em alternativa aos já disponíveis no OsiriX. Deste modo, foram também incluídos neste estudo os filtros mencionados anteriormente, juntamente com os disponíveis no OsiriX, para averiguar aquele que possibilita o melhor desempenho na segmentação da SN.

Para a aplicação dos filtros ANLM e PR-NLM foi utilizado o algoritmo *Fast and robust Nonlocal Means Denoising* [46]. Para o *Edge-preserving smoothing*, foi utilizado um algoritmo desenvolvido por Nikolaou et al. [12], que permite ao utilizador escolher o número de iterações desejado. Para este estudo foi testado o algoritmo com 1, 3 e 5 iterações, identificados como *Edge 1*, *Edge 3* e *Edge 5*, respetivamente. Para a aplicação destes filtros foi utilizado o MATLAB (Versão 2014b, The Mathworks Inc., MA, EUA).

Quanto aos filtros do OsiriX, uma vez que não temos acesso ao código base, pouco se sabe sobre as suas características. Por esse motivo, procurou-se clarificar o modo de atuação destes filtros nas imagens. O primeiro passo consistiu em extrair o *kernel* característico de cada filtro. Para tal, foi criada uma imagem sintética constituída por zeros e apenas um ponto central de valor 1. Aplicou-se cada filtro do OsiriX à imagem sintética e extraíram-se de cada nova imagem gerada os respetivos valores de intensidade, que contêm o resultado da convolução da imagem sintética com o *kernel* a descobrir. Como a imagem sintética é constituída por um só píxel de valor 1, o resultado da convolução é o próprio *kernel*. Na figura 3.2 estão apresentados o *kernels* dos filtros do OsiriX em estudo.

Observando os *kernels* é possível verificar que o filtro *Low Pass* (Figura 3.2 - c)) é um simples filtro de média 3×3 . Os *kernels* dos filtros *Gaussian Blur*, *Blur* e *Smooth* apresentam estruturas semelhantes (Figura 3.2 - a), b) e d)). Para avaliar o poder de esbatimento destes filtros foi calculado o parâmetro *Full width at half maximum* (FWHM), com base nos valores dos *kernels*. Quanto maior for o valor de FWHM maior será o poder de esbatimento do filtro. Na tabela 3.1 estão apresentados os valores de FWHM calculados, assim como as dimensões dos respetivos *kernels*.

0,0192	0,0192	0,0385	0,0192	0,0192
0,0192	0,0385	0,0769	0,0385	0,0192
0,0385	0,0769	0,1538	0,0769	0,0385
0,0192	0,0385	0,0769	0,0385	0,0192
0,0192	0,0192	0,0385	0,0192	0,0192

a)

0,0167	0,0167	0,0167	0,0167	0,0167
0,0167	0,0667	0,0667	0,0667	0,0167
0,0167	0,0667	0,2000	0,0667	0,0167
0,0167	0,0667	0,0667	0,0667	0,0167
0,0167	0,0167	0,0167	0,0167	0,0167

b)

0,1111	0,1111	0,1111
0,1111	0,1111	0,1111
0,1111	0,1111	0,1111

c)

0,0625	0,1250	0,0625
0,1250	0,2500	0,1250
0,0625	0,1250	0,0625

d)

Figura 3.2: Representação dos *kernels* dos filtros do OsiriX em análise. a) Filtro *Gaussian Blur*; b) Filtro *Smooth*; c) Filtro *Low Pass*; d) Filtro *Blur*.

Tabela 3.1: Parâmetros dos filtros do OsiriX em análise

Filtro	FWHM (Píxeis)	Dimensão do <i>kernel</i> (Píxeis)
<i>Gaussian blur</i>	2	5×5
<i>Blur</i>	2	3×3
<i>Smooth</i>	1,5	5×5
<i>Low pass</i>	-	3×3

3.1.1.3 Parâmetros de segmentação em estudo

O algoritmo de segmentação escolhido foi o *Confidence*. Este método exige três parâmetros - multiplicador, número de iterações e raio inicial (em píxeis). O algoritmo *Confidence* apresenta a vantagem de não necessitar diretamente de limites de intensidade na imagem a segmentar, facto que reforçou a decisão de se utilizar este método no presente estudo.

Para o processo de escolha do filtro que permite obter o melhor desempenho de segmentação era importante ter como controlo o cenário em que nenhum método de filtragem era aplicado. Assim sendo, de forma a seleccionar que parâmetros de segmentação poderiam ser utilizados nos testes, foram exploradas diversas combinações em imagens e observados os efeitos na identificação das regiões de interesse pretendidas.

Na figura 3.3 estão ilustrados alguns exemplos que representam a generalidade dos

3.1. OTIMIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX PARA QUANTIFICAÇÃO DA NEUROMELANINA

cenários de segmentação gerados pela variação dos parâmetros nas imagens testadas. É possível observar que apenas um dos conjuntos (2- Multiplicador, 2- N° Iterações, 1- Raio) possibilitou a correta identificação da SN, de modo que durante a fase inicial dos testes aos filtros foram mantidos esses parâmetros.

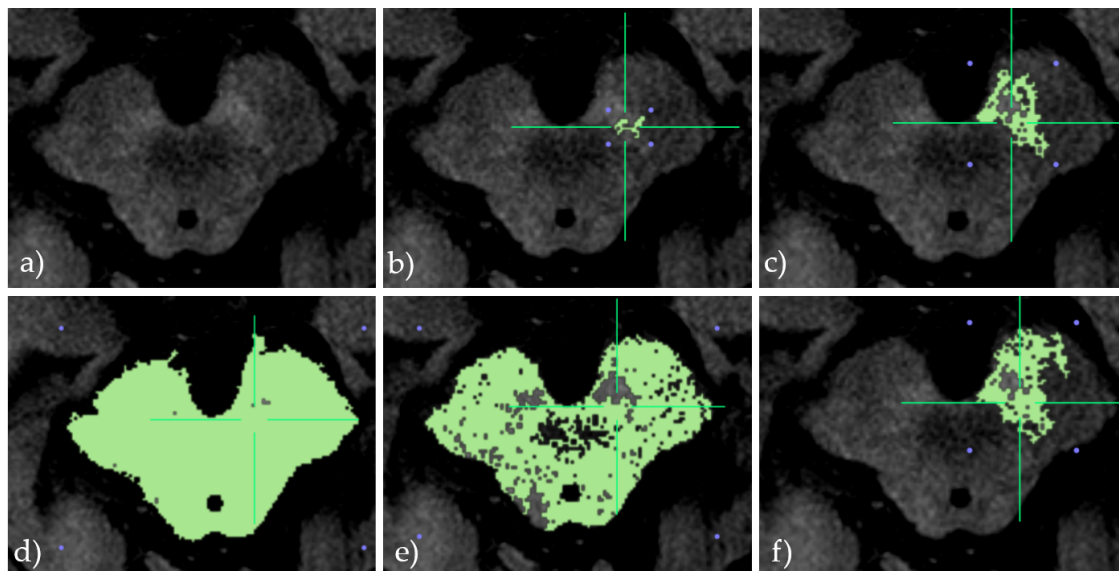


Figura 3.3: Diferentes resultados de segmentação das áreas da *substantia nigra* (SN) em imagens sensíveis à neuromelanina não filtradas, com a variação dos parâmetros do algoritmo *Confidence*. (a) Imagem com as regiões da SN a segmentar; (b) Regiões de interesse geradas com os parâmetros 1 1 1, (c) 2 2 1, (d) 3 2 1, (e) 2 4 1, (f) 2 2 2, sendo os valores: multiplicador, n° iterações e raio, respectivamente.

Posteriormente, após a seleção do filtro que possibilitou o melhor desempenho na segmentação das áreas da SN, foram novamente variados os parâmetros de segmentação (Figura 3.4). Utilizando-se um multiplicador de valor 1, verificou-se que as regiões indicadas pelo algoritmo apresentavam áreas muito pequenas em relação à área da SN visualizada, enquanto que com um multiplicador maior ou igual a 3 verificou-se o oposto, ou seja, a região indicada correspondia praticamente a todo o pedúnculo cerebral (Figura 3.4 - c), d). Relativamente ao raio, verificou-se que a partir de três píxeis, as regiões indicadas sobrestimavam o valor de área real, verificando-se por vezes a impossibilidade de segmentar as regiões da SN (Figura 3.4 - e), f). Quanto ao número de iterações, verificou-se que com valor 1 ocorria uma forte subestimação da área (Figura 3.4 - b). Observou-se que valores de iterações superiores a 4 não alteravam o desempenho da segmentação (Figura 3.4 - g), h).

Na tabela 3.2 estão apresentados todos os parâmetros testados. Por questão de facilidade, daqui em diante os parâmetros de segmentação utilizados serão mencionados com uso à nomenclatura atribuída.

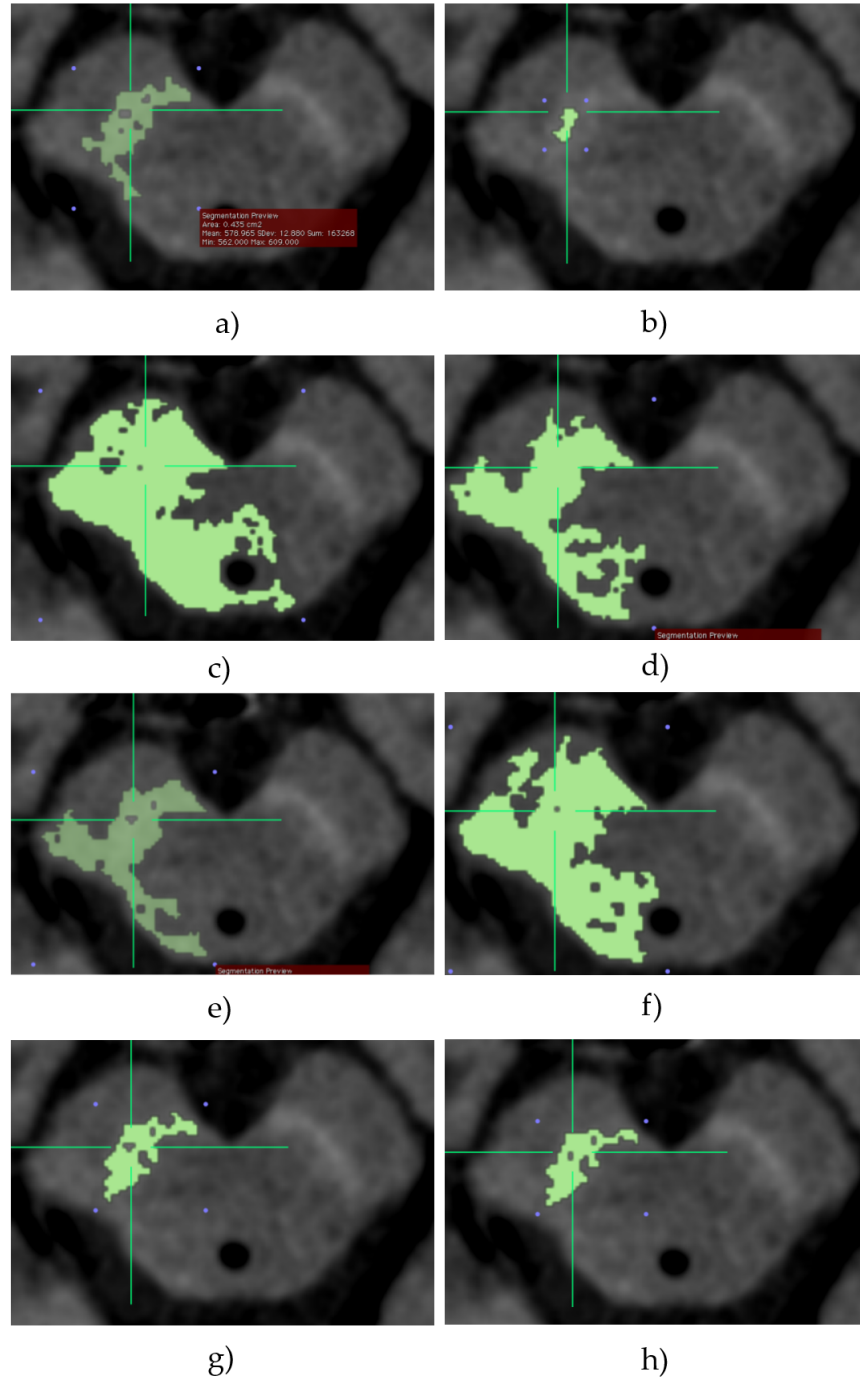


Figura 3.4: Diferentes resultados de segmentação das áreas da *substantia nigra* (SN), em imagens sensíveis à neuromelanina filtradas, com a variação dos parâmetros do algoritmo *Confidence*: (a) 2 2 1; (b) 2 1 1; (c) 3 2 1; (d) 3 1 1; (e) 2 2 3; (f) 2 2 4; (g) 2 4 1; (h) 2 5 1, multiplicador, nº iterações e raio, respetivamente.

3.1. OTIMIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX PARA QUANTIFICAÇÃO DA NEUROMELANINA

Tabela 3.2: Parâmetros de segmentação do algoritmo *Confidence* da ferramenta do OsiriX em análise.

Multiplicador	Iterações	Raio (Píxeis)	Nomenclatura
2	2	1	221
2	2	2	222
2	3	1	231
2	3	2	232
2	4	1	241
2	4	2	242

3.1.1.4 Métodos para avaliação do desempenho dos filtros e parâmetros na segmentação

Para estudar o desempenho dos filtros e dos parâmetros, foram objeto de estudo 5 imagens de RM, obtidas através do protocolo apresentado na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Protocolo de aquisição da técnica de imagem por ressonância magnética sensível à neuromelanina

Protocolo	TR	TE	Nº ecos	Nº cortes	Espessura de corte	FOV	Resolução
FSE T1	633 ms	10 ms	3	20	2,5 mm	220 × 190 mm ²	0,40 × 0,40 mm ²

Nos testes foram utilizadas as duas regiões de cada imagem (lado esquerdo e direito), consideradas independentes, perfazendo um total de 10 regiões em estudo. Cada região foi submetida a uma segmentação manual, utilizando-se para o efeito uma ferramenta do OsiriX que permite desenhar sobre a imagem a região que se pretende segmentar (Figura 3.5 - a)). Todas as segmentações manuais foram confirmadas por um Neurorradiologista. As regiões da SN segmentadas foram isoladas e guardadas para utilização como referência (Figura 3.5 - c)).

Quanto à segmentação semiautomática, foi utilizada a ferramenta de segmentação do OsiriX com o algoritmo *Confidence*. Inicialmente foram aplicados os vários filtros às imagens, segmentando-se de seguida as duas regiões (lado esquerdo e direito), colocando-se o cursor sobre as áreas correspondentes à SN (Figura 3.5 - b)). Cada região de interesse identificada pelo algoritmo foi guardada independentemente (Figura 3.5 - d)).

O processo de avaliação foi dividido em três fases. Numa primeira fase foram avaliados os desempenhos gerais dos filtros. Numa segunda fase realizou-se novamente o processo de segmentação com os filtros que obtiveram o melhor desempenho, tendo-se adicionado um novo passo ao procedimento – *brush closing*. Esta ferramenta do OsiriX permite uniformizar as áreas de interesse marcadas pelo algoritmo, que até ao momento

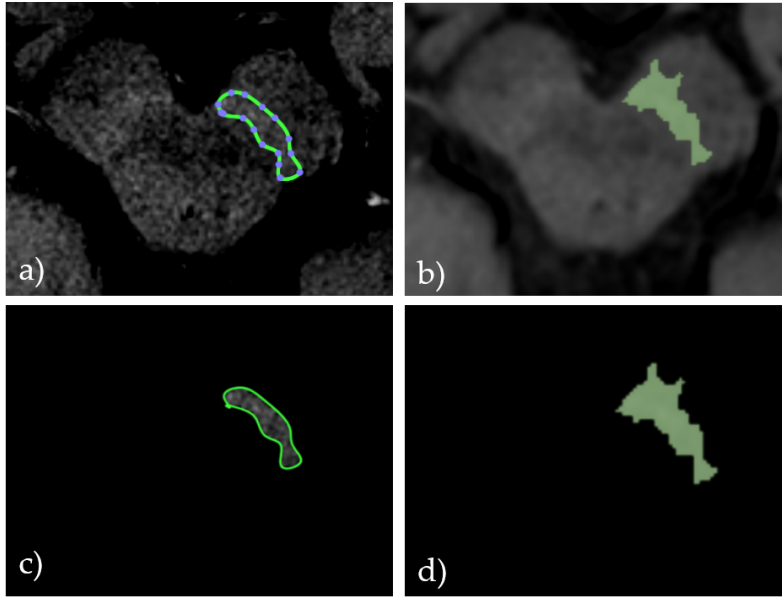


Figura 3.5: Exemplo da aplicação do método de segmentação manual (a) e semiautomática, após filtragem (b) de uma região da SN, realizadas no OsiriX numa imagem sensível à neuromelanina. Resultados da aplicação do método que permite isolar as respetivas áreas de interesse marcadas pelo algoritmo *Confidence* (c,d).

poderiam conter lacunas no seu interior, não sendo contabilizadas para o cálculo automático da área (Figura 3.6). Na terceira fase, após a eleição do melhor filtro, foram testados os diferentes parâmetros de segmentação possíveis.

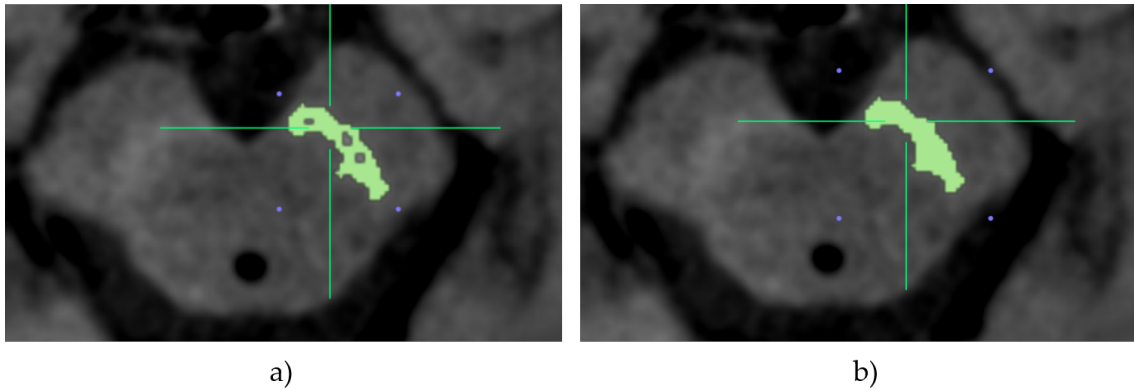


Figura 3.6: Segmentação da área da SN com o algoritmo *Confidence* com parâmetros 2 - multiplicador, 2-iterações, 1- raio em IRM sensíveis à neuromelanina antes (a) e depois (b) da aplicação do método *brush closing* do OsiriX.

Como critérios de avaliação foram utilizadas duas medidas: Erro relativo (Equação 3.1) e o coeficiente de similaridade de Dice (Equação 3.2).

$$Erro\ relativo\ (\%) = \frac{área_{manual} - área_{semiautomática}}{área_{manual}} \quad (3.1)$$

3.1. OTIMIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX PARA QUANTIFICAÇÃO DA NEUROMELANINA

Na equação 3.1 a $\text{área}_{\text{manual}}$ corresponde ao valor da área segmentada manualmente e $\text{área}_{\text{semiautomática}}$ a área calculada pela ferramenta de segmentação semiautomática.

Esta métrica dá-nos uma avaliação quantitativa da influência da aplicação de cada filtro no desempenho da segmentação, em termos de valor de área medida. No entanto, não nos dá informação direta sobre as diferenças espaciais entre a região segmentada pela ferramenta utilizada e a segmentada manualmente. Para tal quantificação é calculado o coeficiente de similaridade de Dice (CSD), que é obtido através da equação 3.2.

$$\text{CSD} = \frac{2|A \cap B|}{|A| + |B|} \quad (3.2)$$

Na equação 3.2, $|A|$ representa a região segmentada pelo método semiautomático e $|B|$ representa a região segmentada manualmente. O CSD mede a sobreposição espacial das duas regiões de interesse, complementando a avaliação de desempenho dada pelo cálculo do erro relativo. É um método bastante utilizado para estudar e comparar a reprodutibilidade em procedimentos de segmentação de regiões em imagem médica [47]. O CSD calculado varia entre 0, situação em que as regiões não se intersectam e 1, em que ocorre total sobreposição.

Para o cálculo do CSD foi desenvolvida uma pequena aplicação auxiliar em MATLAB. A aplicação (Apêndice A) permite abrir e visualizar duas imagens DICOM, visualizar as diferenças entre ambas e calcular o CSD. As imagens DICOM sujeitas a comparação contêm apenas as regiões segmentadas isoladas, uma correspondente ao resultado do método manual e outra à do método semiautomático, para a mesma região.

O algoritmo utilizado para calcular o CSD trata a imagem como se fosse binária. Considera todos os valores de intensidade diferentes de 0 (preto) como 1 (branco), permanecendo a área de interesse a branco e o meio envolvente a preto.

3.1.1.5 Testes Estatísticos

Para a comparação dos valores de erro relativo e CSD calculados foi utilizado o teste estatístico não-paramétrico para comparações múltiplas de Kruskal-Wallis (KW) com correção de Bonferroni. Neste teste, p -values inferiores a 0,05 indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparados.

Os testes estatísticos foram realizados no programa R (Versão 3.3.1, The R Foundation for Statistical Computing).

3.1.2 Resultados

3.1.2.1 1ª Fase - Avaliação geral do desempenho dos filtros

Na tabela 3.4, estão apresentados os resultados da influência da aplicação de filtros no desempenho da segmentação semiautomática. É importante ter em consideração que o procedimento em que nenhum filtro foi aplicado não permitiu a segmentação de uma das regiões, assim como os procedimentos em que foram aplicados os filtros ANLM e

CAPÍTULO 3. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE SEGMENTAÇÃO

PRI-NLM não permitiram a de duas regiões cada, verificando-se que ocorreria uma sobre-estimação clara da área da SN.

Tabela 3.4: Resultados da avaliação (1ª Fase) do desempenho dos filtros na segmentação da área da *substantia nigra*.

Filtro	CSD mediana (<i>range</i>)	Erro Relativo (%) mediana (<i>range</i>)
Sem filtro	0,74 (0,54 – 0,76)	13,5 (2,0 – 33,4)
<i>Gaussian Blur</i>	0,75 (0,64 – 0,98)	8,0 (1,4 – 31,9)
<i>Blur</i>	0,80 (0,64 – 0,91)	8,5 (3,2 – 44,5)
<i>Low Pass</i>	0,75 (0,63 – 0,83)	7,9 (1,6 – 26,5)
<i>Smooth</i>	0,75 (0,66 – 0,89)	15,4 (1,4 – 28,5)
<i>Edge 1</i>	0,77 (0,47 – 0,96)	14,9 (5,5 – 65,8)
<i>Edge 3</i>	0,76 (0,60 – 0,89)	14,9 (1,4 – 40,2)
<i>Edge 5</i>	0,78 (0,61 – 0,89)	16,7 (8,5 – 41,3)
ANLM	0,76 (0,59 – 0,90)	15,7 (0,2 – 52,7)
PRI-NLM	0,73 (0,54 – 0,83)	16,0 (6,4 – 57,6)

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em análise, para os valores de erro relativo ou CSD, tendo-se obtido *p-values* globais no teste KW de 0,64 e 0,96, respetivamente.

O filtro *Low Pass* e o filtro *Gaussian Blur* foram os que apresentaram o erro relativo mediano mais baixo, seguindo-se o *Blur*. Os restantes filtros obtiveram erros relativos medianos maiores que o registado para o procedimento sem aplicação de filtro, de valor 13,5 % (Tabela 3.4). Apesar da sobreposição entre os grupos, é possível verificar a diferença na tendência dos valores de erro relativo entre os filtros *Gaussian Blur*, *Blur*, *Low Pass* e os restantes (Figura 3.7).

Relativamente ao CSD, todos os procedimentos nos quais foram aplicados filtros apresentaram valores medianos superior ao registado no procedimento sem filtro, com exceção do grupo em que foi aplicado o filtro PRI-NLM. Destacam-se os filtros *Blur*, *Edge 1* e o *Edge 5*, que obtiveram os valores medianos mais altos de CSD (Tabela 3.4). No entanto, observando os valores de CSD calculados, verifica-se que tanto para o procedimento em que nenhum filtro foi aplicado, como para os filtros *Edge 1*, *Smooth* e *Edge 3* se registaram valores que não se enquadram nas respetivas distribuições, refletindo alguma incoerência no desempenho de segmentação, em termos de preservação espacial da região de interesse (Figura 3.8).

3.1. OTIMIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX PARA QUANTIFICAÇÃO DA NEUROMELANINA

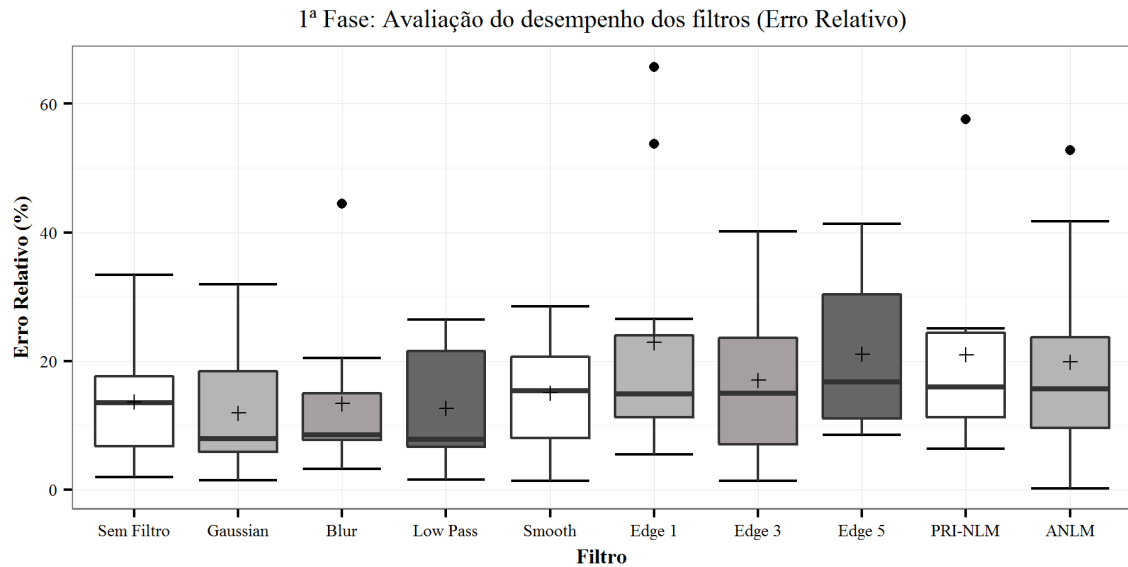


Figura 3.7: Erros relativos calculados para as regiões hiper-intensas da *substantia nigra* em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, segmentadas através dos procedimentos de segmentação semiautomática que incluíam a aplicação dos diferentes filtros, correspondente à 1ª fase da avaliação em estudo.

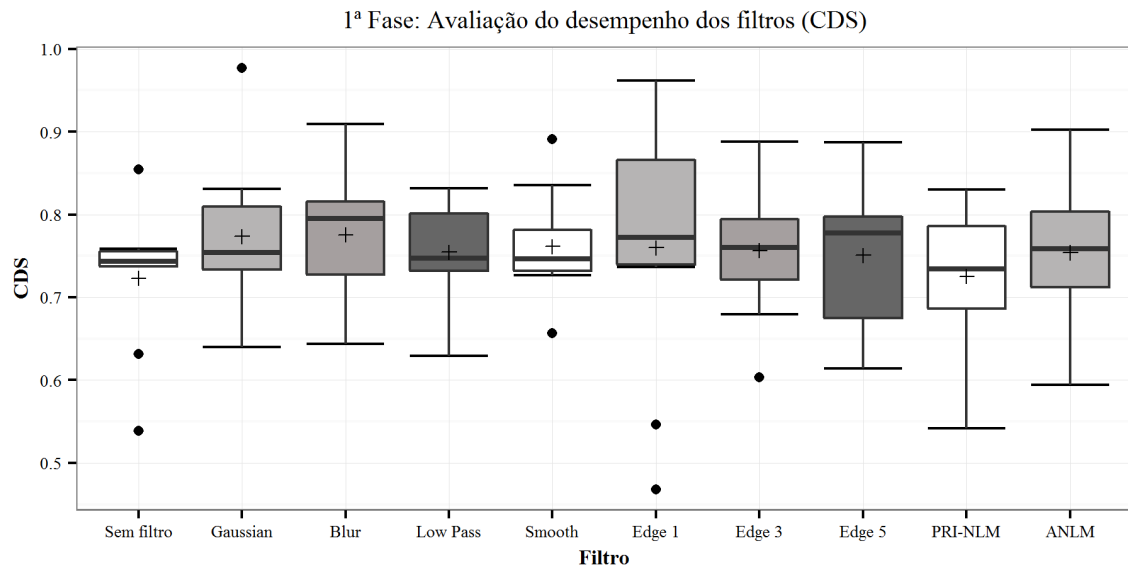


Figura 3.8: Coeficientes de similaridade de Dice (CSD) calculados para as regiões hiper-intensas da *substantia nigra* em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, segmentadas através dos procedimentos de segmentação semiautomática que incluíam a aplicação dos diferentes filtros, correspondente à 1ª fase da avaliação em estudo.

3.1.2.2 2ª Fase - Avaliação do desempenho dos melhores filtros

Na tabela 3.5 estão apresentados os resultados relativos à segunda fase de testes, na qual foram selecionados os filtros que possibilitaram o melhor desempenho de segmentação na fase anterior – *Gaussian Blur*, *Blur* e *Low Pass*. Nesta fase, foi adicionado ao procedimento o método *Brush closing*, que consiste na eliminação de lacunas nas áreas de interesse identificadas.

Tabela 3.5: Resultados da avaliação (2ª Fase) do desempenho dos filtros na segmentação da área da *substantia nigra*

Filtro	CSD mediana (<i>range</i>)	Erro Relativo (%) mediana (<i>range</i>)
<i>Gaussian Blur</i>	0,82 (0,65 - 0,96)	10,97 (2,43 - 17,69)
<i>Blur</i>	0,84 (0,67 - 0,88)	16,19 (3,90 - 37,22)
<i>Low Pass</i>	0,80 (0,67 - 0,91)	7,60 (1,90 - 23,84)

Nos testes KW realizados não se observaram diferenças estatisticamente significativas, registrando-se *p-values* de 0,25 e 0,90 para os valores de erro relativo e CSD, respectivamente.

Os filtros *Gaussian Blur* e *Low Pass* apresentaram um desempenho semelhante em termos de erro relativo, com o último a obter um erro relativo mediano mais baixo, com 7,60 %. No entanto, o grupo em que foi aplicado o filtro *Gaussian Blur* apresentou uma menor variabilidade que o grupo correspondente ao filtro *Low Pass* em termos de valores de erros relativos. O grupo *Gaussian Blur* registou um erro mediano ligeiramente superior ao obtido na fase anterior, apesar de se ter verificado uma diminuição no *range* de valores. O procedimento em que foi aplicado o filtro *Blur* obteve um pior desempenho nesta fase, tendo-se registado um erro mediano de 16,19% (Tabela 3.5, Figura 3.9).

Nesta fase foram observados maiores valores de CSD medianos nos três grupos em comparação com a fase anterior (Tabela 3.5, Figura 3.10).

3.1. OTIMIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX PARA QUANTIFICAÇÃO DA NEUROMELANINA

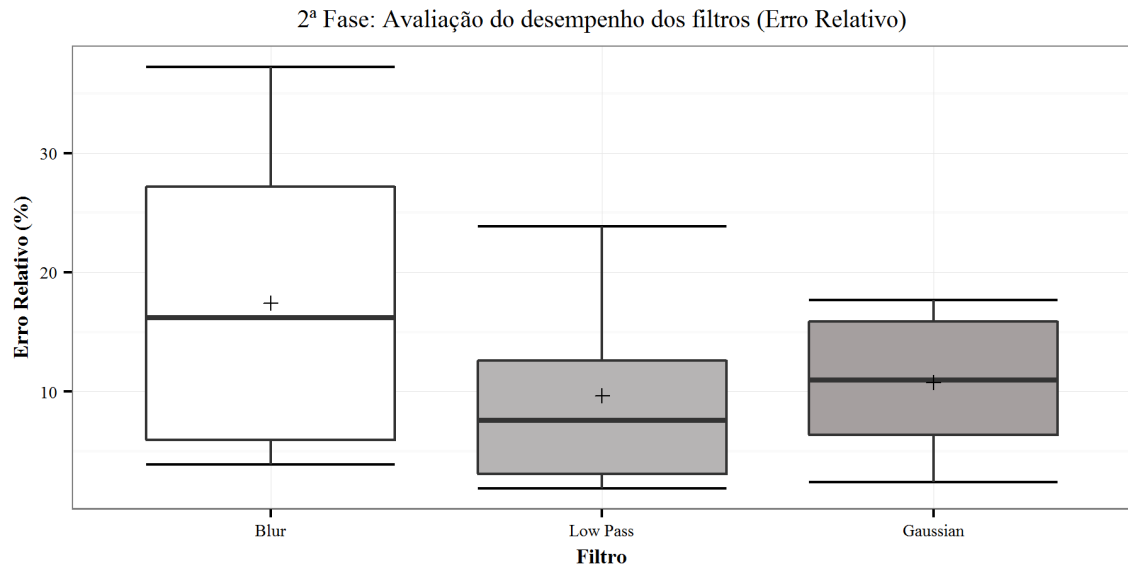


Figura 3.9: Erros relativos calculados para as regiões hiper-intensas da *substantia nigra* em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, segmentadas através dos procedimentos de segmentação semiautomática que incluíam a aplicação dos filtros *Blur*, *Low Pass* e *Gaussian Blur*, correspondente à 2ª fase da análise.

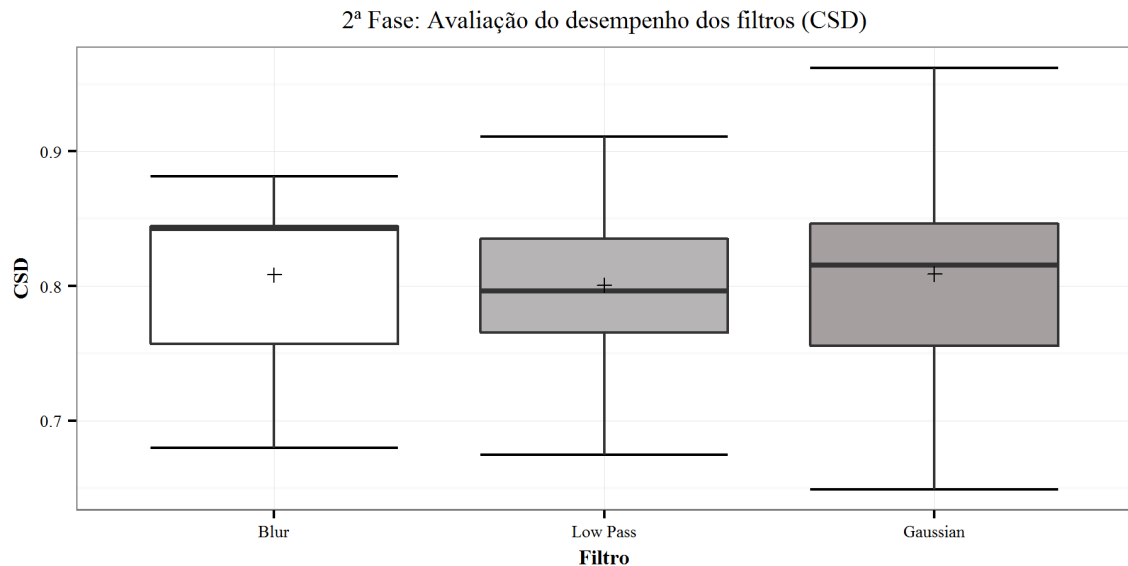


Figura 3.10: Coeficientes de similaridade de Dice (CSD) calculados para as regiões hiper-intensas da *substantia nigra* em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, segmentadas através dos procedimentos de segmentação semiautomática que incluíam a aplicação dos filtros *Blur*, *Low Pass* e *Gaussian Blur*, correspondente à 2ª fase da análise.

3.1.2.3 3ª Fase - Avaliação do desempenho dos parâmetros de segmentação

Na última fase de testes foi avaliada a influência dos parâmetros de segmentação no procedimento. Para todos os procedimentos em estudo nesta etapa foi utilizado o filtro *Gaussian Blur*, tendo-se considerado que este permitiu obter na generalidade um melhor desempenho na segmentação das regiões de interesse. Na tabela 3.6 estão apresentados os resultados dos testes efetuados aos parâmetros de segmentação do algoritmo *Confidence*.

Tabela 3.6: Resultados da avaliação (3ª Fase) dos parâmetros no desempenho da segmentação da área da *substantia nigra*. Os parâmetros apresentados seguem a nomenclatura: multiplicador, nº de iterações, raio.

Parâmetros	CSD mediana (<i>range</i>)	Erro Relativo (%) mediana (<i>range</i>)
221	0,82 (0,65 – 0,96)	11,0 (2,4 – 17,7)
222	0,79 (0,65 – 0,89)	23,4 (14,5 – 39,5)
231	0,81 (0,46 – 0,91)	12,9 (1,3 – 66,5)
232	0,79 (0,38 – 0,89)	15,6 (8,7 – 75,6)
241	0,79 (0,50 – 0,94)	15,9 (2,0 – 62,4)
242	0,77 (0,58 – 0,90)	25,5 (12,0 – 67,5)

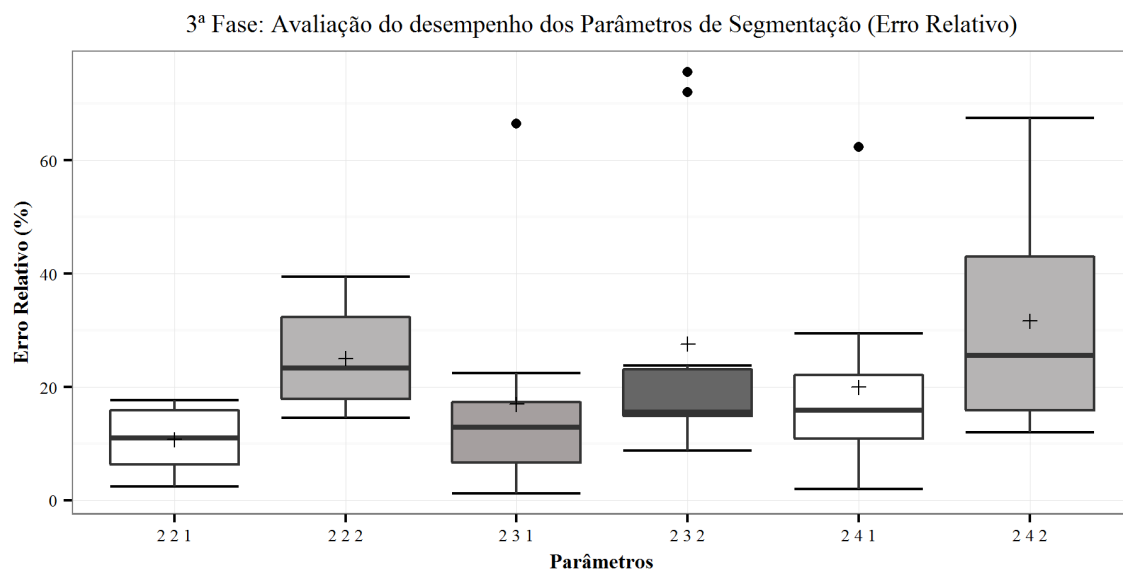


Figura 3.11: Erros relativos calculados para as regiões hiper-intensas da *substantia nigra* em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, segmentadas através dos procedimentos de segmentação semiautomática que incluíam a aplicação de diferentes parâmetros de segmentação, correspondente à 3ª fase da análise.

O teste estatístico KW efetuado indicou diferenças estatisticamente significativas nos valores de erros relativos entre os grupos de parâmetros 221 – 222 e 221 – 242, com *p-values* de 0,01 e 0,02 respetivamente. Nas restantes comparações entre grupos não foram encontradas diferenças significativas (*p-values* > 0,05). Quanto aos valores de CSD não

3.1. OTIMIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX PARA QUANTIFICAÇÃO DA NEUROMELANINA

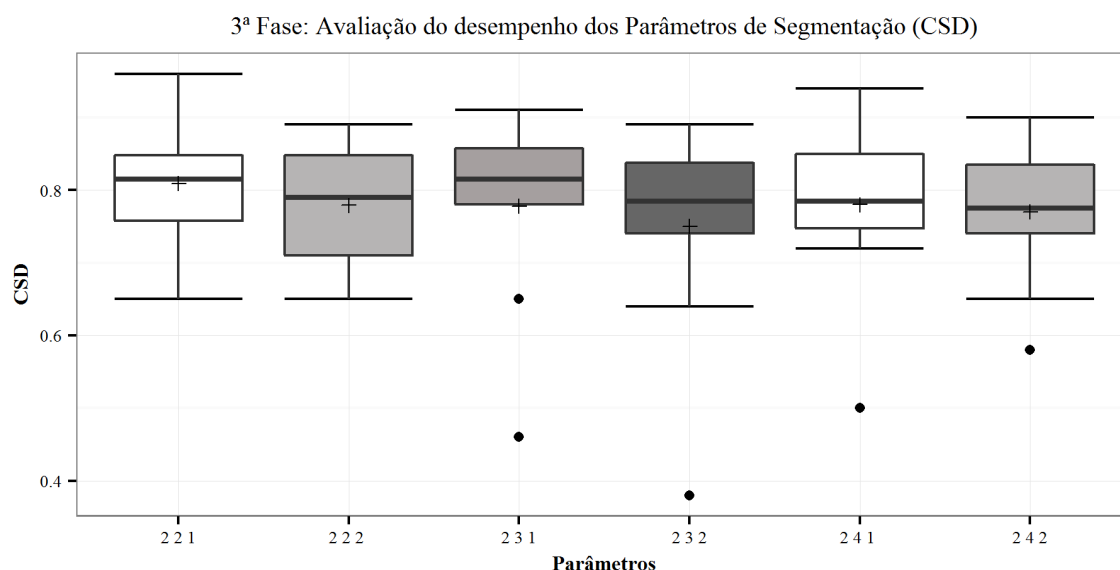


Figura 3.12: Coeficientes de similaridade de Dice (CSD) calculados para as regiões hiper-intensas da *substantia nigra* em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, segmentadas através dos procedimentos de segmentação semiautomática que incluíam a aplicação de diferentes parâmetros de segmentação, correspondente à 3ª fase da análise.

foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p -value de 0,95).

O conjunto de parâmetros de segmentação 221 foi o que obteve melhor desempenho no que diz respeito ao valor de erro relativo, com um erro mediano de 11,0%. Para os conjuntos de parâmetros com o mesmo número de iterações, os que tinham um menor raio apresentaram menor erro relativo mediano (Tabela 3.6, Figura 3.11). Nos valores de CSD não se registaram praticamente diferenças nos valores medianos. Com exceção dos parâmetros 221 e 222, todos os outros conjuntos apresentaram pelo menos um *outlier* no CSD, indicando uma variabilidade alta (Tabela 3.6, Figura 3.12).

3.1.3 Discussão

As segmentações de regiões da SN permitem calcular valores de áreas, possibilitando uma quantificação indireta da neuromelanina. Para tal, a utilização de uma ferramenta semiautomática de segmentação devidamente otimizada, implica o estabelecimento de um procedimento de pré-processamento, que permita preparar a imagem de forma a tornar este processo o mais fiável possível, próximo de uma segmentação manual.

A pré-filtragem da imagem mostrou ser uma parte essencial no procedimento desenvolvido, na medida em que melhorou substancialmente o desempenho do algoritmo *Confidence* na segmentação das regiões pretendidas. Pelo facto de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em análise, foram comparadas as distribuições dos valores de erro relativo e CSD calculados, no processo de escolha do melhor filtro. Inicialmente, dos nove filtros testados, três (*Gaussian Blur*, *Blur*, *Low Pass*)

obtiveram um desempenho superior ao da segmentação semiautomática realizada sem a aplicação prévia de um filtro. Os restantes filtros (*Smooth*, ANLM, PRI-NLM, *Edge 1*, *Edge 3*, *Edge 5*) não contribuíram na generalidade para melhorar o processo de segmentação.

Os filtros ANLM e PRI-NLM são filtros complexos, que se propõem a reduzir substancialmente o ruído mantendo os detalhes essenciais, de forma a causar um esbatimento mínimo na imagem. Por sua vez, os filtros da família *Edge-Preserving*, preservam as fronteiras entre regiões, enquanto reduzem o ruído esbatendo o seu interior. O sinal da neuromelanina apesar de se diferenciar do meio em redor, em protocolos de imagem sensíveis ao pigmento como o utilizado, pode ser bastante variável em termos de intensidade, o que dificulta o processo de segmentação. Os filtros que provocam um esbatimento mais acentuado da imagem revelaram-se mais eficientes neste processo, pois diminuem essa mesma variabilidade de intensidades, uniformizando a região apesar de não manterem as fronteiras entre regiões bem definidas. De facto, o grande objetivo da otimização do procedimento de segmentação é melhorar o desempenho do algoritmo, sendo a prioridade identificar áreas de interesse o mais próximas possível das obtidas por segmentação manual, mesmo que implique esbater as fronteiras.

Dos filtros de convolução do OsiriX, o *Smooth* foi único que teve um desempenho médio inferior ao da segmentação sem filtro, em termos de erro relativo. Apesar de serem todos filtros que eliminam as altas frequências, o nível de esbatimento varia com a configuração dos *kernels* aplicados, sendo atribuídos pesos distintos aos elementos de cada máscara. O algoritmo *Confidence* considera os pontos pertencentes à região quando estão incluídos no intervalo estabelecido pelo desvio padrão multiplicado pelo fator imposto. Os filtros mencionados ao reduzirem a variabilidade das intensidades da região, facilitam o processo de inclusão dos diversos píxeis visualmente constituintes. Apesar desta variabilidade não ter sido quantificada, a filtragem recorrendo a este tipo de filtros aparenta apresentar a vantagem de minimizar o erro inerente à localização do *seed point* na utilização de ferramentas de segmentação semiautomática. Em imagens não filtradas, a colocação do *seed point* em diferentes localizações na região de interesse produzia resultados de segmentação distintos. Apesar de se ter tentado manter a localização do *seed point* fixa em todas as regiões em análise, no grupo em que nenhum filtro foi aplicado foi necessário ajustar esse ponto inicial em diversas ocasiões, de modo a tornar a região identificada pelo algoritmo plausível como SN. Por sua vez, foi verificado que em imagens filtradas por filtros que provocam o esbatimento das intensidades, a variação dos resultados da segmentação consoante a posição do *seed point* é fortemente atenuada.

Na segunda fase da análise, com a introdução do método *brush closing*, verificou-se uma melhoria nos valores medianos de CSD dos grupos de filtros que obtiveram um melhor desempenho geral na fase anterior (*Gaussian Blur*, *Blur* e *Low Pass*). Os grupos apresentaram uma menor amplitude de valores de erro relativo em relação à fase anterior, tendo-se observado erros máximos mais baixos. Este método revelou ser essencial, na medida em que corrige possíveis lacunas contidas nas regiões marcadas pelo algoritmo. Apesar de não se terem verificado diferenças significativas entre os grupos, o filtro *Blur*

3.1. OTIMIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX PARA QUANTIFICAÇÃO DA NEUROMELANINA

obteve um erro mediano mais elevado que o dos outros grupos, tendo-se verificado distribuições de valores semelhantes entre os filtros *Low Pass* e *Gaussian Blur*. Tendo em conta o maior valor de CSD mediano e menor erro relativo máximo verificados no procedimento em que foi aplicado o *Gaussian Blur*, decidiu-se utilizar este filtro em deterioramento ao *Low Pass*.

Por fim, com o filtro escolhido, foi possível otimizar os parâmetros do algoritmo de segmentação. Enquanto os valores medianos do CSD dos vários conjuntos testados se mantiveram relativamente próximos, diferenças no erro relativo permitiram distinguir o seu desempenho. Verificou-se que o conjunto de parâmetros 2 (Multiplicador), 2 (Iterações) e 1 (Raio) permitiu obter resultados mais próximos dos da segmentação manual. Para um dado valor de raio, à medida que se aumentou o número de iterações, os erros medianos aumentaram, indicando que para uma deteção ideal das regiões, 2 iterações seriam suficientes. Verificou-se igualmente que para um número de iterações fixo, aumentando o raio de 1 para 2 píxeis, os erros aumentavam, uma vez que as áreas eram sobrestimadas. O multiplicador, parâmetro que multiplica o desvio padrão para estabelecer o intervalo de inclusão, foi mantido sempre com valor 2, verificando-se que um aumento deste parâmetro não melhorava os resultados da segmentação. Os resultados são concordantes com o padrão observado aquando a escolha dos parâmetros a serem testados. Verificou-se que o aumento do raio, assim como do número de iterações conduzia a uma sobrestimação gradual das áreas de interesse. Raios maiores, possibilitam a análise de um maior número de píxeis vizinhos, que perto das regiões fronteiras da SN poderá incluir conjuntos de píxeis exteriores como pertencentes à área de interesse. Por sua vez, a cada iteração é analisada a região marcada e efetuada nova inclusão de píxeis vizinhos que satisfaçam os novos critérios de inclusão, de modo que um aumento desse número facilitará a inclusão de píxeis que não pertencem à região da SN, traduzindo-se numa sobrestimação da área. O filtro *Gaussian Blur* ao esbater as fronteiras entre regiões, poderá facilitar o crescimento exagerado de regiões, reforçando a importância de se utilizar parâmetros de segmentação apropriados ao método de filtragem escolhido.

Os parâmetros de qualquer ferramenta de segmentação devem ser ajustados tendo em conta as características da imagem e das regiões que se pretendem segmentar. Com os testes realizados, conseguiu-se estabelecer um procedimento de segmentação final, composto por uma fase de pré-processamento, na qual é aplicado o filtro *Gaussian Blur*, de identificação da região recorrendo ao algoritmo *Confidence* e por fim na aplicação de um método de *Brush Closing*, que permite uniformizar a região detetada, otimizada para quantificar a neuromelanina em imagens sensíveis a este pigmento.

3.2 Ferramenta de segmentação do OsiriX vs. MATLAB no diagnóstico diferencial da Doença de Parkinson

Nesta secção, o procedimento de segmentação anteriormente desenhado foi testado num estudo real, no qual foi comparado com um procedimento de segmentação desenvolvido em projetos de dissertação anteriores [5, 7], igualmente otimizado para a identificação das regiões da SN. Deste modo, pretendia-se averiguar qual dos métodos possibilita uma discriminação mais precisa entre indivíduos saudáveis e doentes com DP.

3.2.1 Materiais e métodos

3.2.1.1 Descrição da amostra

No presente estudo foram utilizadas imagens de RM de 32 indivíduos (Tabela 3.7), dos quais 10 são saudáveis, considerados controlos, 12 diagnosticados com Doença de Parkinson em estágio inicial, grupo denominado DP *de novo* e 10 com a doença entre 2 a 5 anos, grupo denominado DP 2 a 5.

Tabela 3.7: Dados demográficos dos controlos saudáveis e doentes com Doença de Parkinson (DP).

	Controlos	DP <i>de novo</i>	DP 2 a 5
Nº (Feminino/Masculino)	10 (4/6)	12 (7/5)	10 (2/8)
Idade (média ± desvio padrão)	61 ± 7	63 ± 12	67 ± 10

Os doentes com DP foram recrutados da Unidade de Doenças do Movimento do Centro Hospitalar Lisboa Norte, EP - Hospital de Santa Maria (HSM) no âmbito do projeto de doutoramento em Imagiologia da Dra. Sofia Reimão. Os diagnósticos da DP foram realizados por neurologistas especialistas em doenças do movimento, segundo os critérios da *United Kingdom Brain Bank Criteria* (UKBBC) e avaliados com a *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) [30]. Todos os indivíduos deram o seu consentimento informado e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do HSM.

Os doentes DP *de novo* foram incluídos no momento de diagnóstico, caso não estivessem sob medicação anti-Parkinson e tivessem sido diagnosticados em menos de 6 meses do aparecimento dos primeiros sintomas. Por sua vez, os doentes do grupo com DP entre 2 a 5 anos estavam a receber terapia farmacológica com levodopa. Foram considerados como critérios de exclusão a presença de demência, doença psiquiátrica ou contraindicações para a realização de exames de IRM em campos de 3T.

As imagens foram adquiridas na Sociedade Portuguesa de Ressonância Magnética e no HSM, em equipamentos de RM Achieva 3T (Philips Medical Systems, Best, Holanda), com uma bobina de 8 canais. Foi utilizada uma sequência *Fast Spin-Echo* (FSE) com

ponderação em T1, característica para a visualização da neuromelanina (Tabela 3.3), tal como proposta por Sasaki et al. [35].

Os cortes foram cuidadosamente colocados no plano axial, perpendiculares ao pavimento do IV ventrículo. Todas as imagens foram avaliadas por um experiente neurorradiologista para excluir outras patologias que pudessem interferir na análise a ser realizada.

3.2.1.2 Segmentação das regiões da *substantia nigra*

Segmentação no ambiente OsiriX

Para a quantificação da neuromelanina no ambiente Osirix, foi utilizada a ferramenta de segmentação 2D cuja arquitetura e otimização do procedimento estão explicitados na secção 3.1.

Tipicamente, com o protocolo utilizado, o sinal hiper-intenso da neuromelanina é visível em três cortes, tendo-se selecionado para análise o corte mediano, que corresponde ao plano onde está contido o maior volume da SN.

As imagens, devidamente anonimizadas e isentas de classificação de grupo, foram inicialmente submetidas à aplicação do filtro *Gaussian Blur*, disponível no ambiente OsiriX. Como discutido na secção 3.1.1, variações no posicionamento dos *seed points* produzem resultados de segmentação distintos, apesar da aplicação do filtro *Gaussian Blur* contribuir para uma redução dessa variabilidade. Não obstante, com a finalidade de manter o mesmo critério para todas as imagens, traçou-se um segmento de recta coincidente com a fossa cisterna interpeduncular (Figura 3.13). Sobre a recta, na zona mais intensa da SN foi posicionado o *seed point*. Posteriormente, foi utilizada a ferramenta de segmentação, com o algoritmo *Confidence* de parâmetros 221 selecionados. Depois de se visualizar automaticamente a área de interesse marcada pelo algoritmo, aplicou-se o método *brush closing*, na qual as lacunas presentes nas regiões são eliminadas.

Para cada imagem, o procedimento de segmentação semiautomática foi executado para cada um dos lados da SN, registando-se um valor de área para o lado direito e outro para o lado esquerdo.

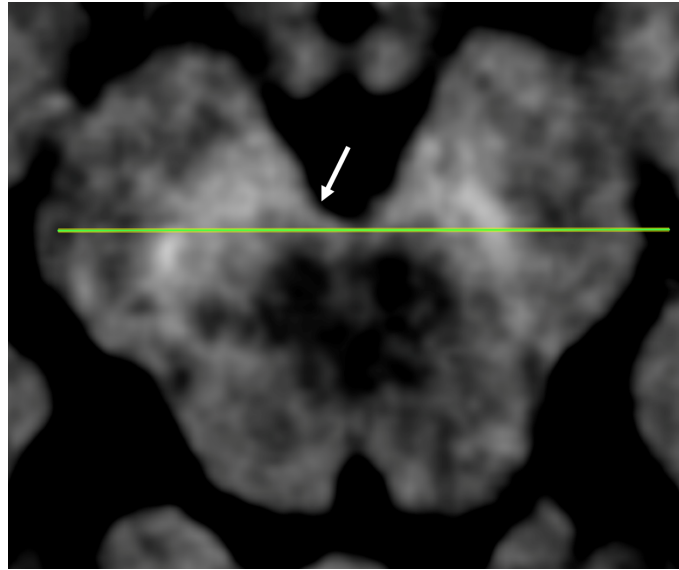


Figura 3.13: IRM sensível à neuromelanina, com a localização do segmento de recta coincidente com a fossa cisterna interpeduncular (seta), para marcação do *seed point* necessário à segmentação da área da *substantia nigra*.

Segmentação no ambiente MATLAB

Em projetos anteriores [5, 7], a segmentação da região da SN foi realizada com recurso ao algoritmo *Thereshold* da família *Region Growing*, implementado numa aplicação desenvolvida em MATLAB. Num desses projetos [5], foi desenvolvido um procedimento de otimização da ferramenta para a identificação ideal da região de interesse. O procedimento desenvolvido envolvia a aplicação do filtro ANLM na fase de pré-processamento, pois nesse estudo a aplicação deste filtro conduzia aos resultados mais promissores. O único parâmetro de segmentação exigido ao utilizador, o limiar de intensidades, foi fixado a 2,5% em relação à intensidade máxima presente na imagem.

Para a presente análise, foram utilizados os dados oriundos do projeto anteriormente descrito, sendo igualmente utilizada a amostra apresentada na secção 3.2.1.1.

3.2.1.3 Métodos para comparação das ferramentas

Para a comparação das duas ferramentas, a área da SN de cada indivíduo foi medida nos dois lados da SN com ambos os procedimentos de segmentação.

Para esta avaliação, foi utilizada a análise com recurso a curvas *receiver operating characteristic* (ROC). A análise com curvas ROC é indicada para a avaliação do desempenho de classificadores binários, na qual é traçada uma curva que resulta da taxa de verdadeiros positivos (TPR, do inglês *true positive rate*) em função da taxa de falsos positivos (FPR, do inglês *false positive rate*) detetados para os diversos limiares de classificação em análise. A TPR é correspondente à razão entre o número de casos classificados como positivos que o são de facto e o número total de casos considerados positivos. A FPR é calculada com a

3.2. FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX VS. MATLAB NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA DOENÇA DE PARKINSON

razão entre o número de falsos positivos classificados sobre o número total de negativos em análise.

Através das curvas ROC geradas é possível calcular o valor de área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*) que está associada ao poder discriminante dos classificados, ideal para comparação entre diferentes métodos.

Para esta análise, os valores de áreas médias da SN de cada indivíduo, medidas por cada uma das ferramentas, foram classificados como doentes ou não doentes consoante o grupo a que pertencem. Os indivíduos dos grupos DP *de novo* e DP 2 a 5 foram ambos classificados como doentes. Foi utilizada uma biblioteca específica [48] para a geração e análise de curvas ROC no programa R.

3.2.2 Resultados

Para simplificar, o procedimento otimizado no ambiente OsiriX, que utiliza o filtro *Gaussian Blur* e o algoritmo de segmentação *Confidence* será referido como segmentação OsiriX. O procedimento otimizado no ambiente MATLAB, que utiliza o filtro ANLM e o algoritmo de segmentação *Threshold*, será mencionado como segmentação MATLAB.

Na tabela 3.8 encontram-se apresentados os resultados da análise às áreas da SN segmentadas através das duas ferramentas descritas.

Tabela 3.8: Resultados da segmentação das áreas da SN recorrendo aos dois procedimentos de segmentação em análise. No método de segmentação OsiriX foi utilizado o filtro *Gaussian Blur* e o algoritmo *Confidence* (Multiplicador – 2; Iterações – 2; Raio – 1 píxel). No método de segmentação MATLAB foi aplicado o filtro ANLM e o algoritmo *Threshold* (Limiar – 2,5%).

Grupo	Segmentação OsiriX	Segmentação MATLAB
	Área(mm ²) mediana (<i>range</i>)	Área(mm ²) mediana (<i>range</i>)
Controlos	40,6 (33,0 - 55,6)	26,5 (20,1 - 33,1)
DP <i>de novo</i>	27,7 (17,1 - 36,0)	20,9 (11,3 - 50,0)
DP 2 a 5	22,7 (8,6 - 46,8)	20,1 (13,2 - 37,9)

Nas figuras 3.14 e 3.15 estão ilustradas as distribuições das áreas da SN medidas com os procedimentos de segmentação OsiriX e MATLAB, respetivamente. É possível observar que a segmentação OsiriX permite distinguir o grupo Controlo dos grupos de doentes, havendo uma clara diferença nos valores das áreas medianas dos grupos. Por sua vez, os dois grupos de doentes apresentam valores medianos mais próximos, verificando-se sobreposição entre os grupos (Figura 3.14, Tabela 3.8). Nos resultados da segmentação MATLAB, as diferenças das áreas entre grupos são muito menores, verificando-se que o grupo Controlo apresenta um valor de área mediano ligeiramente superior aos dos grupos de doentes. Entre os grupos DP não existe praticamente diferença nos valores medianos das áreas, verificando-se uma total sobreposição (Figura 3.15, Tabela 3.8).

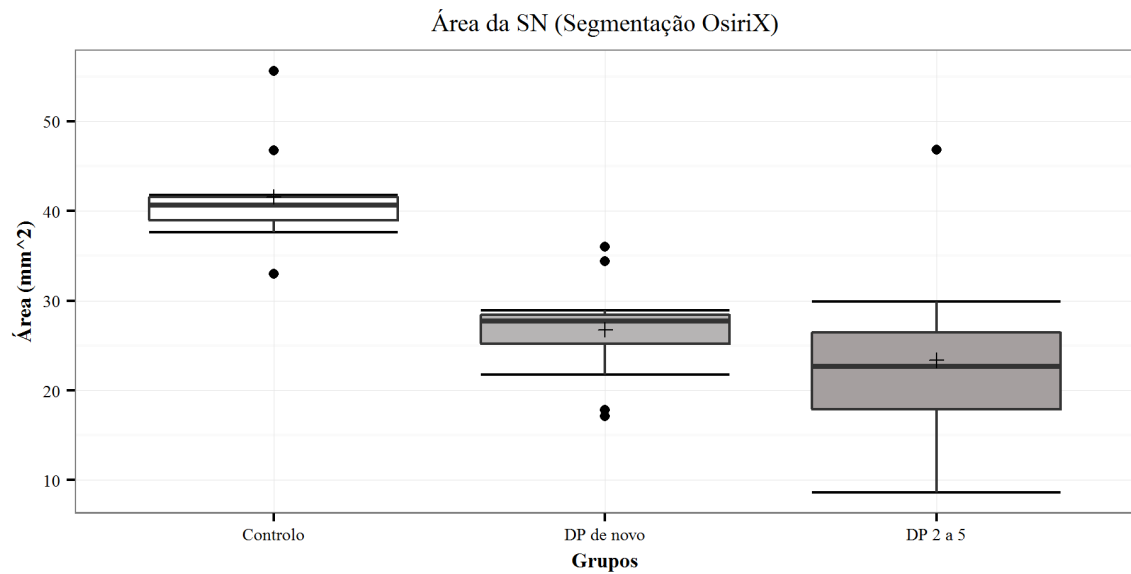


Figura 3.14: Área das regiões hiper-intensas correspondentes à *substantia nigra* (SN) em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, segmentadas com o procedimento de segmentação OsiriX, de indivíduos saudáveis (Controlo) e doentes com Doença de Parkinson (DP) diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*) e com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5).

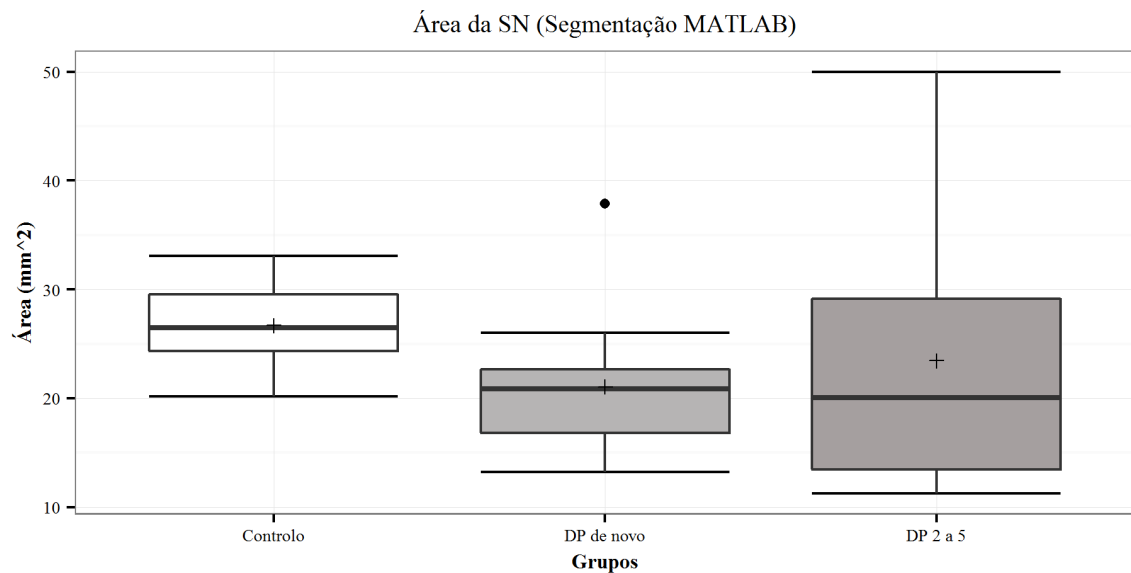


Figura 3.15: Área das regiões hiper-intensas correspondentes à *substantia nigra* (SN) em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, segmentadas com o procedimento de segmentação MATLAB, de indivíduos saudáveis (Controlo) e doentes com Doença de Parkinson (DP) diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*) e com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5).

3.2. FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX VS. MATLAB NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA DOENÇA DE PARKINSON

Nos testes KW foram registados *p-values* globais de $1,053 \times 10^{-5}$ e 0,066 para as segmentações OsiriX e MATLAB, respetivamente. Foram realizados testes de KW com correção de Bonferroni para comparação entre os grupos. Os *p-values* obtidos estão apresentados na tabela 3.9.

Tabela 3.9: Resultados da aplicação do teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni. Significância para *p-values* inferiores a 0,05.

Grupos	Segmentação OsiriX <i>p-value</i>	Segmentação MATLAB <i>p-value</i>
Controlos - DP 2 a 5	0,0001	0,181
Controlos - DP <i>de novo</i>	0,0002	0,081
DP 2 a 5 - DP <i>de novo</i>	0,6679	1,000

Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Controlo e os grupos de DP na segmentação das áreas da SN realizada no ambiente OsiriX, não tendo sido encontradas diferenças entre os dois grupos DP. Das segmentações realizadas através do procedimento segmentação MATLAB, não foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre qualquer par de grupos (Tabela 3.9).

Nas figuras 3.16 e 3.17 encontram-se ilustradas as curvas resultantes das análises ROC às áreas obtidas pelos métodos Segmentação Osirix e MATLAB, respetivamente.

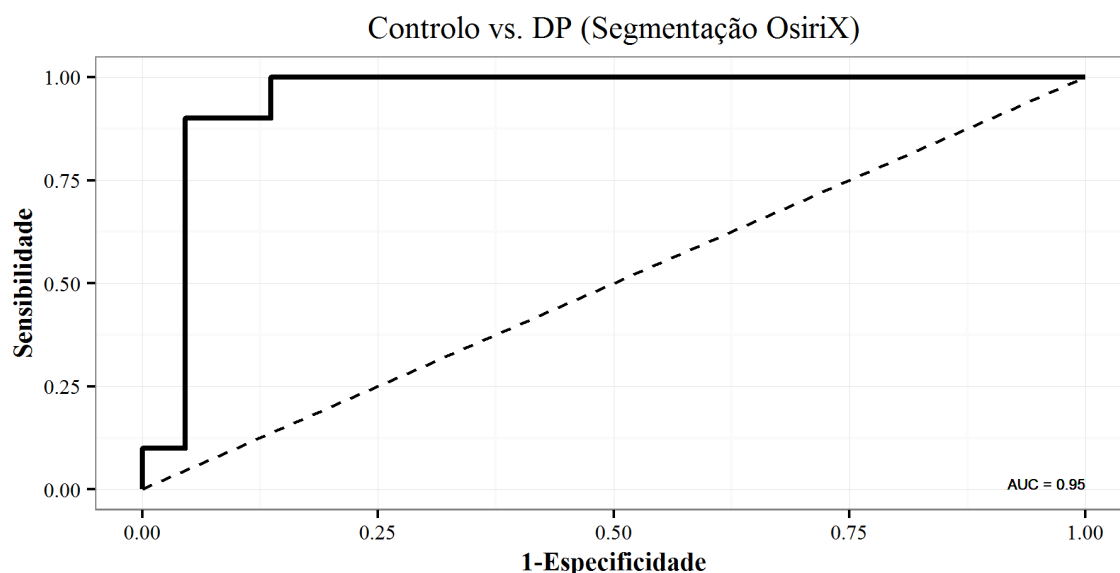


Figura 3.16: Curvas *Receiver operator Characteristic* (ROC) das áreas da *substantia nigra*, segmentadas com o procedimento de segmentação OsiriX, para diferenciar indivíduos saudáveis de doentes com Doença de Parkinson (incluem doentes *de novo* e com a doença entre 2 a 5 anos).

Na tabela 3.10, estão apresentados os resultados pormenorizados da análise ROC das áreas para a diferenciação entre Controlos e DP, segmentadas com os dois procedimentos de segmentação. Verificou-se que a sensibilidade dos métodos é idêntica, 90%, tendo-se

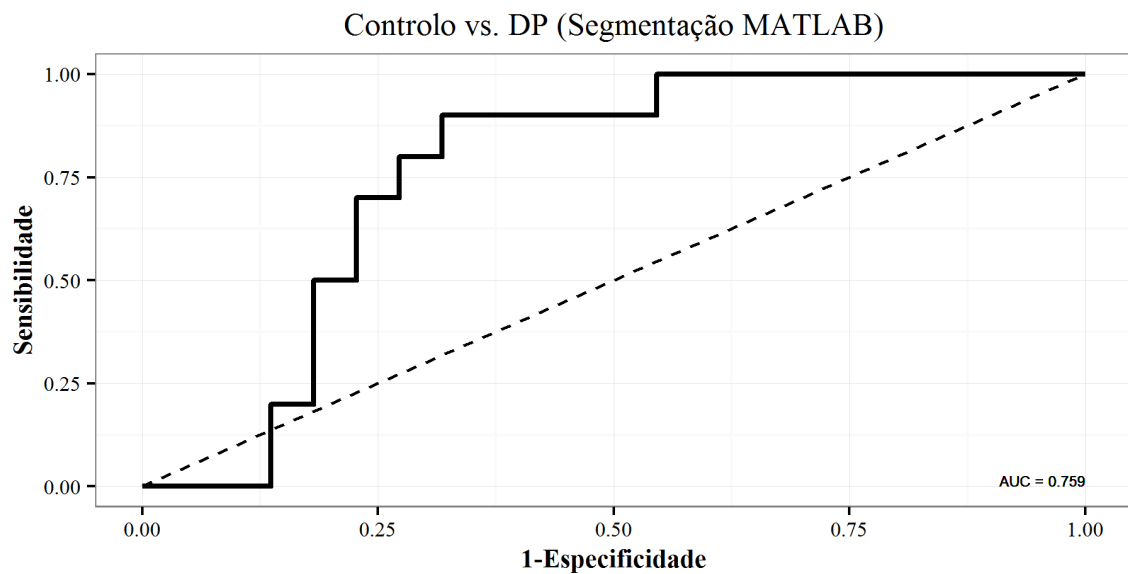


Figura 3.17: Curvas *Receiver operator Characteristic* (ROC) das áreas da *substantia nigra*, segmentadas com o procedimento de segmentação MATLAB, para diferenciar indivíduos saudáveis de doentes com Doença de Parkinson (incluem doentes *de novo* e com a doença entre 2 a 5 anos).

registados diferentes valores de especificidade, 95% para a segmentação Osirix e 68% para a segmentação MATLAB, refletindo-se nos valores de AUC obtidos.

Tabela 3.10: Análise ROC aos valores das áreas medidas com os dois procedimentos de segmentação em estudo para discriminação de indivíduos saudáveis de doentes com Doença de Parkinson.

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC	<i>cut-off</i>
Segmentação OsiriX	90	95	0,95	37,7 mm ²
Segmentação MATLAB	90	68	0,76	22,6 mm ²

Na figura 3.18 está apresentado um gráfico Bland-Altman, que permite visualizar as diferenças entre as medições efetuadas pelo procedimento de segmentação OsiriX e MATLAB. É possível verificar que a maior parte dos valores que refletem a diferença entre as medições das áreas efetuadas com os procedimentos OsiriX e MATLAB tomam valores positivos (eixo vertical). Esta análise permite complementar os diagramas de caixas anteriormente apresentados (Figura 3.14, Figura 3.15), nos quais se observam maiores valores de áreas medidos pelo procedimento OsiriX. Entre os grupos Controlo as diferenças são mais acentuadas, sendo que todos os valores de áreas medidos pelo OsiriX são maiores que os equivalentes no MATLAB.

3.2. FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX VS. MATLAB NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA DOENÇA DE PARKINSON

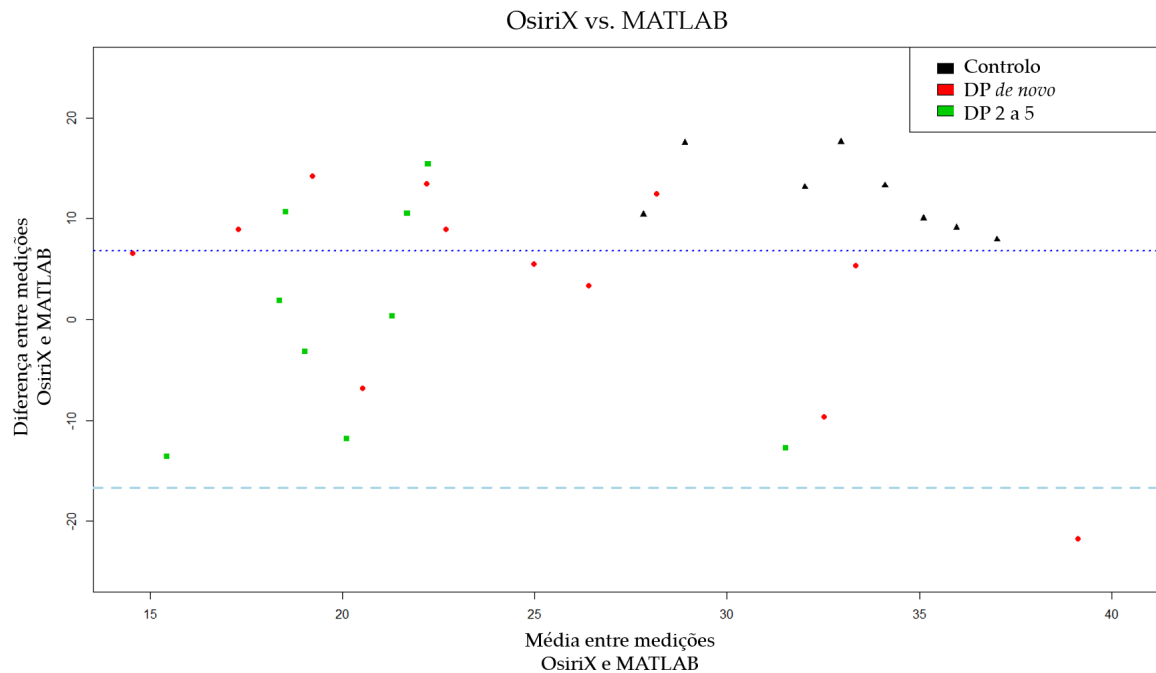


Figura 3.18: Diferenças entre as medições efetuadas pelos procedimentos de segmentação OsiriX e MATLAB em função da média das respetivas medições.

3.2.3 Discussão

No presente estudo foram comparados dois procedimentos de segmentação semiautomática distintos, que utilizam diferentes algoritmos de segmentação e filtros na fase de pré-processamento. No procedimento OsiriX foram utilizados um filtro *Gaussian Blur* e o algoritmo *Confidence*, enquanto que no procedimento de segmentação MATLAB foi realizado com recurso ao algoritmo *Threshold*, em imagens filtradas com o filtro ANLM. Neste estudo, foram comparados os dados resultantes dos dois procedimentos com o objetivo de averiguar qual a ferramenta que permite diferenciar melhor controlos saudáveis de indivíduos com DP. Tal distinção é fundamental como método complementar no processo de diagnóstico da DP. Para tal, para além da análise estatística das áreas medidas, foram calculados os valores de especificidade e sensibilidade resultantes da análise ROC efetuada.

A análise estatística aos valores das áreas medidos através do procedimento de segmentação OsiriX relevou diferenças significativas entre os grupos Controlo e os dois grupos de doentes, DP *de novo* e DP 2 a 5. De facto, era expectável que se detetasse tal diferença, na medida em que estudos patológicos anteriores detetaram perda neuronal na SNpc, o que se traduz numa redução da área observada nas imagens sensíveis à presença de neuromelanina [18]. Entre os grupos DP *de novo* e DP 2 a 5 não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas, apesar de se observar uma clara tendência de diminuição dos valores das áreas da SN à medida que a doença vai progredindo. Por sua vez, nos

dados que resultaram do procedimento de segmentação MATLAB não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre qualquer par de grupos em análise. No entanto, é importante sublinhar que na comparação entre os grupos Controlo e DP de novo, foi registado um *p-value* na ordem dos 0,081, ligeiramente mais elevado que o valor limiar de 0,05, o que é consistente com a pequena sobreposição verificada nos dados.

A análise ROC permitiu complementar a análise estatística. Ambos os métodos obtiveram um valor de sensibilidade idêntico, diferenciando-se na especificidade. O procedimento de segmentação OsiriX obteve um valor mais elevado, de especificidade de 95%, que consequentemente se traduz no maior valor de AUC calculado. Os valores de AUC refletem a precisão do classificador, sendo que um AUC de valor 1 representa um classificador perfeito, ou seja, as classificações por ele atribuídas não apresentam erros. O método de segmentação OsiriX, obteve um AUC de 0,95, valor considerado excelente para um classificador. Este valor significa que este método apresenta um poder de discriminação entre controlos e doentes maior que o método de segmentação MATLAB, que obteve um AUC de 0,76.

As diferenças substanciais nos valores de *cut-off* calculados refletem perfeitamente as diferenças nos valores de áreas medidos pelos dois métodos, sobretudo entre os grupos Controlo e DP *de novo*. As áreas do grupo Controlo medidas com o procedimento MATLAB são substancialmente menores que as medidas através do OsiriX, facto que é consistente com a subestimação das áreas de interesse verificadas visualmente. A análise efetuada permitiu concluir que a ferramenta de segmentação OsiriX, com o método *Confidence* e com os parâmetros otimizados deteta com maior exatidão as áreas de interesse, permitindo diferenciar com sucesso doentes de controlos, com base no valor da área da SN. Estes resultados reforçam um dos princípios apresentados na secção 3.1, na qual foi sublinhada a importância da escolha e otimização dos algoritmos de segmentação e da sua conjugação com as características da região de interesse a segmentar. Com a mesma amostra de imagens, os dois procedimentos distintos em análise produziram diferentes resultados, que por sua vez seriam interpretados de modo diferente. O teste de um novo algoritmo e a arquitetura de um novo procedimento revelou ter sido um passo fundamental na investigação em que o presente estudo se insere.

Para além da análise efetuada, é importante discutir algumas diferenças nos aspetos funcionais dos procedimentos em estudo. O procedimento de segmentação MATLAB exige que o operador efetue 3 ações: a aplicação do filtro, introdução do limiar de intensidades desejado e aplicação do *seed point* na localização pretendida. O filtro ANLM é exigente em termos de processamento, demorando em média 2,5 minutos por corte [5], o que torna a análise de uma imagem relativamente demorada. O procedimento de segmentação OsiriX apresenta a grande vantagem de estar integrado num programa que inclui um visualizador DICOM, comunicável com sistemas hospitalares, podendo ser utilizado comodamente em ambiente clínico. Exige que o operador efetue 4 etapas: aplicação do filtro, introdução dos parâmetros de segmentação desejados, escolha da localização do

3.2. FERRAMENTA DE SEGMENTAÇÃO DO OSIRIX VS. MATLAB NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA DOENÇA DE PARKINSON

seed point e aplicação do método *brush closing*. O filtro *Gaussian Blur* é de aplicação imediata, não exigindo um processamento de imagem demorado. Apesar de serem passos simples de efetuar, os diversos comandos inerentes ao procedimento estão dispersos pelo próprio *software*, de modo que seria conveniente, no futuro, agrupar todos os métodos num *plug-in*.

ESTUDOS IMAGIOLÓGICOS EM DOENTES COM DOENÇA DE PARKINSON *Late Stage*

Com recurso a um protocolo de IRM sensível à neuromelanina é possível visualizar este pigmento hiper-intenso, cuja diminuição está diretamente associada à Doença de Parkinson (DP). Neste capítulo é apresentado o estudo imagiológico realizado, no qual foi utilizada a ferramenta de segmentação semiautomática do OsiriX para medir a área das regiões da *substantia nigra* (SN) de doentes com DP em diferentes estádios, de acordo com a otimização do procedimento explicitada no Capítulo 3. Pretende-se averiguar que alterações ocorrem ao nível da SN e de volumes de estruturas cerebrais de interesse ao longo da progressão da doença.

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Descrição da amostra

No presente estudo participaram um total de 45 indivíduos (Tabela 4.1), dos quais 10 são saudáveis, considerados controlos, 12 diagnosticados com DP em estágio inicial, grupo denominado DP *de novo*, 10 com a doença entre 2 a 5 anos, grupo denominado DP 2 a 5 e 13 num estágio tardio da doença, grupo denominado DP *late stage*.

Os doentes incluídos nos grupos DP *de novo* e DP 2 a 5 pertencem à amostra descrita na secção 3.2.1.1. Foram incluídos no grupo *late Stage* os doentes com avaliação Schwab and England L Scale (SES) < 50 (Sob efeito de levodopa) ou Hoehn Yahr (HY) Stage > 3 (Sob efeito de levodopa) [20]. Foram excluídos os doentes submetidos a procedimentos de estimulação cerebral profunda ou com DP atípica. Os doentes *late stage* foram recrutados no âmbito do projeto de doutoramento da Dra. Margherita Fabbri, tendo os diagnósticos da DP sido realizados por neurologistas especialistas em doenças do movimento, segundo

CAPÍTULO 4. ESTUDOS IMAGIOLÓGICOS EM DOENTES COM DOENÇA DE PARKINSON *LATE STAGE*

Tabela 4.1: Dados demográficos dos controlos saudáveis e doentes com Doença de Parkinson (DP) *de novo*, com a doença entre 2 a 5 anos de duração e *late stage*.

	Controlos	DP <i>de novo</i>	DP 2 a 5	DP <i>late Stage</i>
Nº (Feminino/Masculino)	10 (4/6)	12 (7/5)	10 (2/8)	13 (6/7)
Idade (média ± desvio padrão)	61 ± 7	63 ± 12	67 ± 10	78 ± 6

os critérios da *United Kingdom Brain Bank Criteria* (UKBBC) e avaliados com a *Movement Disorder Society - Sponsored Revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (MDS-UPDRS) [30].

4.1.2 Análise das imagens de ressonância magnética

Neste estudo foram utilizadas imagens obtidas por dois protocolos diferentes. Foi utilizada uma sequência *Fast Spin-echo* (FSE) ponderada em T1, característica de imagens sensíveis à neuromelanina, com os parâmetros de aquisição apresentados na Tabela 3.3, para as análises relacionadas com o sinal hiper-intenso característico da *substantia nigra* (SN). Para as análises volumétricas foram utilizadas imagens obtidas com a sequência *Turbo Field Echo* (TFE), com os parâmetros de aquisição apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Protocolo de aquisição da técnica de imagem por ressonância magnética TFE utilizada.

Protocolo	TR	TE	Nº ecos	Nº cortes	Espessura de corte	FOV	Resolução
T1 3D TFE SAG	9,6 ms	4,6 ms	1	160	1 mm	164 × 141 mm ²	0,49 × 0,49 mm ²

4.1.2.1 Análise às áreas da SN

Para medição das áreas da SN foi utilizada a ferramenta de segmentação 2D do OsiriX, cuja a metodologia está descrita na secção 3.2.1.2.

Tal como para os grupos Controlo, DP *de novo* e DP 2 a 5, foi utilizado o mesmo procedimento para o grupo DP *late Stage*, que incluiu a filtragem das imagens com o filtro *Gaussian Blur* do Osirix, segmentação com o algoritmo *Confidence* e aplicação do método *Brush Closing* para uniformização das áreas de interesse (Figura 4.1).

Foram registados os valores de áreas medidos do lado esquerdo e direito da SN.

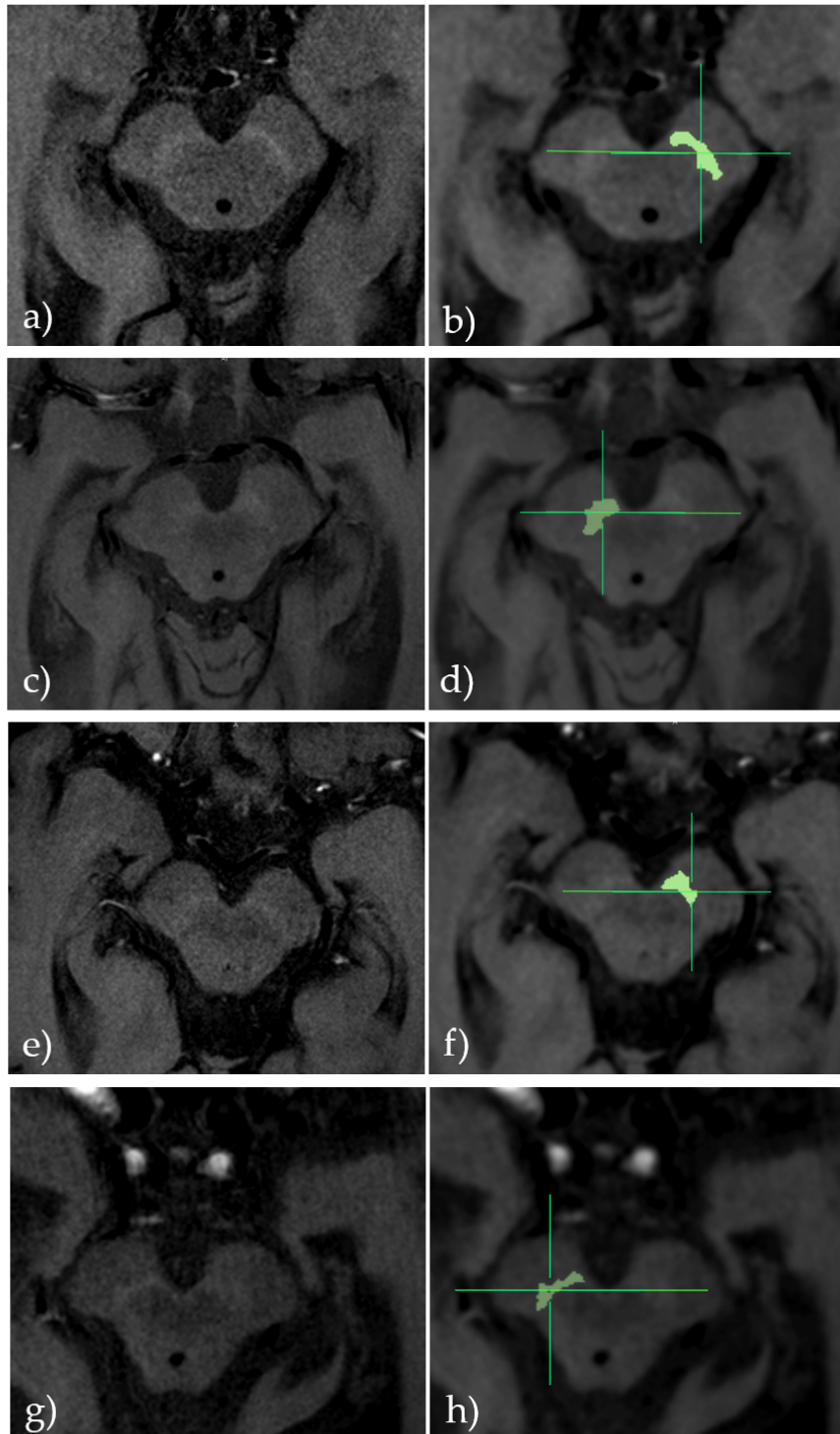


Figura 4.1: Imagens por ressonância magnética sensíveis à neuromelanina de um indivíduo saudável (Controlo) (a,b), de um doente com DP *de novo* (c,d), com a doença de 2 a 5 anos de duração (e,f) e *late stage* (g,h). As imagens do lado direito mostram as áreas de interesse marcadas pelo algoritmo de segmentação utilizado (*Confidence*) após a aplicação do filtro *Gaussian Blur* e do método *brush closing*.

4.1.2.2 Análise das razões de contraste

A análise dos valores das áreas da SN não nos permite aferir a dispersão espacial dessas regiões de interesse segmentadas, dando-nos apenas informação quantitativa das suas dimensões. Ou seja, pode-se saber que um determinado indivíduo apresenta uma redução de área em relação a outro, mas com esse valor não temos informação de que forma essa redução está a ocorrer. Para tal, foi realizada uma análise com razões de contraste (RC), arquitetada de modo a complementar a informação que é possível extrair da análise aos valores das áreas de interesse.

A análise efetuada assenta na principal característica das imagens sensíveis à neuromelanina, nas quais as regiões que contêm o pigmento apresentam um sinal hiper-intenso em comparação com o meio que as rodeia. Deste modo, calculando rácios entre as intensidades de determinados locais da SN (tipicamente hiper-intensa) e a de um local exterior a essa mesma região, é possível quantificar a dispersão espacial da neuromelanina.

Foram utilizadas regiões de interesse (ROI, do inglês *Region of interest*) circulares com área de $4,026 \text{ mm}^2$, posicionadas segundo o esquema ilustrado na figura 4.2.

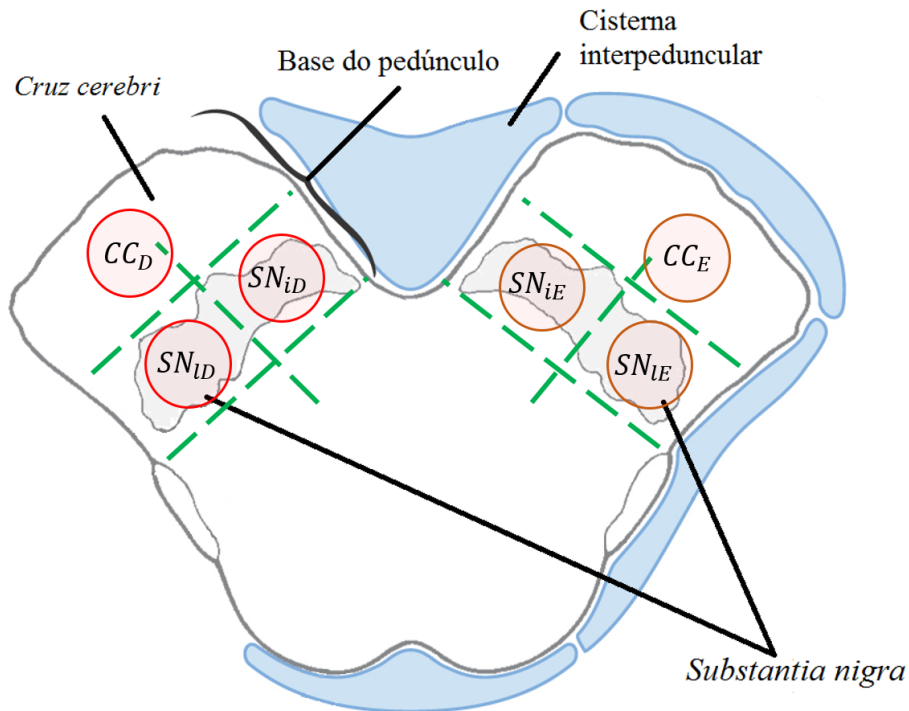


Figura 4.2: Ilustração da posição dos ROIs para o cálculo das razões de contraste da *substantia nigra* (SN), vista num corte axial da região do mesencéfalo ao nível dos gânglios da base. SN_{iD} : ROI colocado na região interna direita da SN; SN_{iE} : ROI colocado na região interna esquerda da SN; SN_{lD} : ROI colocado na região lateral direita da SN; SN_{lE} : ROI colocado na região lateral esquerda da SN; CC_D : ROI colocado no *cruz cerebri* do lado direito; CC_E : ROI colocado no *cruz cerebri* do lado esquerdo (adaptado de [49]).

Para o cálculo das RC foram utilizadas as seguintes equações:

$$RC_{iD} = \frac{SN_{iD}}{CC_D} \quad (4.1)$$

$$RC_{iE} = \frac{SN_{iE}}{CC_E} \quad (4.2)$$

$$RC_{lD} = \frac{SN_{lD}}{CC_D} \quad (4.3)$$

$$RC_{lE} = \frac{SN_{lE}}{CC_E} \quad (4.4)$$

As equações apresentadas anteriormente, são utilizadas para calcular as RC das regiões interna direita (RC_{iD}), interna esquerda (RC_{iE}), lateral direita (RC_{lD}) e lateral esquerda (RC_{lE}). Nestas, ($SN_{iD,iE,lD,lE}$) correspondem ao valor médio das intensidades medidas nas regiões de interesse circular posicionadas na parte interna direita (iD), interna esquerda (iE), lateral direita (lD) e lateral esquerda (lE) da SN, enquanto que CC_E e CC_D correspondem ao valor médio das intensidades medidas nas regiões de interesse localizadas no *Cruz cerebri* (Figura 4.2).

A análise das RC foi realizada nos mesmos cortes onde foram medidas as áreas da SN, com a exceção de que nenhum filtro foi aplicado previamente. A Figura 4.3 corresponde a uma imagem real, contendo o esquema desenhado e utilizado no estudo para o correto posicionamento dos ROIs, utilizados para o cálculo das RC.

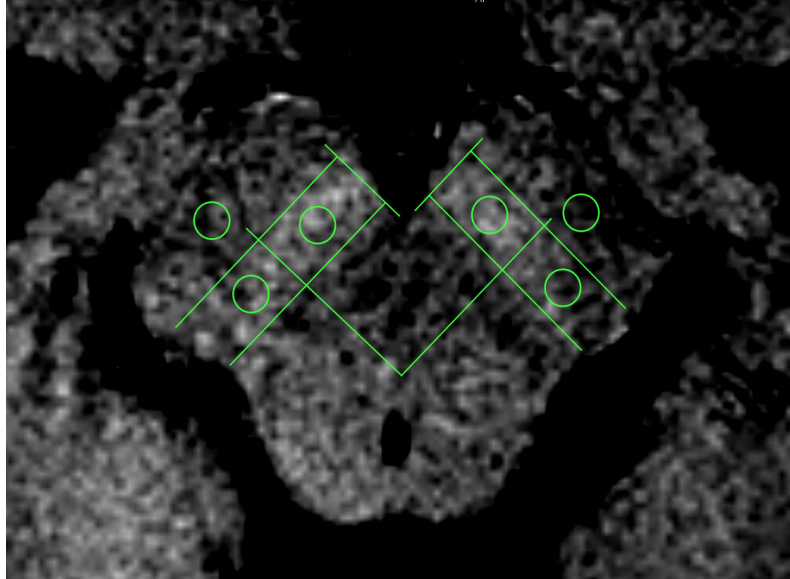


Figura 4.3: Esquema utilizado para medição das intensidade médias com recurso a regiões de interesse circulares posicionadas na região hiper-intensa da *substantia nigra* e numa região exterior(*cruz cerebri*) numa imagem por ressonância magnética sensível à neuromelanina.

4.1.2.3 Análise Volumétrica

Para a análise volumétrica foi utilizado o *software* Freesurfer (The General Hospital Corporation, Boston, MA, EUA, versão 5.3.0) [50]. O Freesurfer é um programa *open*

source especializado na segmentação automática completa do cérebro. É dos programas mais completos que existe atualmente, na medida em que atribui um elevado número de etiquetas aos tecidos cerebrais. As imagens são transformadas para um espaço de coordenadas específico, espaço de Talairach, permitindo remover diferenças anatómicas entre indivíduos. Atribui a cada vóxel da imagem uma etiqueta baseada em informação estatística, correspondendo cada uma a uma estrutura cerebral. Assim, é possível medir o volume de estruturas como o tronco cerebral e os seus constituintes, como o mesencéfalo, protuberância, entre outros.

Esta análise foi realizada para todos os grupos em estudo. Para os grupos Controlo e DP 2 a 5, as imagens já tinham sido processadas com o Freesurfer num projeto de dissertação anterior [51], de modo que foram recolhidos os dados relativos à segmentação do tronco cerebral. As imagens dos elementos do grupo de DP *de novo* e DP *late stage* foram submetidos aos mesmos métodos. No entanto, as análises de dois doentes *late stage* e um *de novo* não foram realizadas com sucesso por motivos relativos às próprias imagens T1-3D, de modo que tiveram que ser retirados desta fase. Para além da segmentação do tronco cerebral, foi realizada a segmentação do hipocampo para todos os indivíduos incluídos neste estudo.

Dos resultados da segmentação do tronco cerebral foram registados os valores dos volumes do mesencéfalo e do tronco cerebral total, calculando-se a designada de fração de volume do mesencéfalo (FVM) conforme a equação 4.5.

$$FVM = \frac{Volume_{mesencéfalo}}{Volume_{tronco\ cerebral}} \quad (4.5)$$

A FVM é calculada de modo a tornar comparáveis os volumes em análise, eliminando-se assim o contributo das diferenças anatómicas globais entre indivíduos.

Por sua vez, dos resultados da segmentação do hipocampo foram retirados os valores correspondentes ao volume total dessa estrutura cerebral. Para se eliminar o contributo das diferenças anatómicas relacionadas com a dimensão global, foi utilizado o volume intracraniano total estimado (VIE) de cada indivíduo para calcular a fração de volume do hipocampo (FVH), conforme a equação 4.6.

$$FVH = \frac{Volume_{hipocampo}}{VIE} \quad (4.6)$$

4.1.3 Severidade e Assimetria na Doença de Parkinson

Na avaliação clínica da DP é utilizada uma escala denominada MDS-UPDRS [52], constituída por diversas partes onde são classificados numa escala de 0 (normal) – 4 (severo) inúmeros parâmetros.

Especificamente, na parte 3 é registada a avaliação motora dos doentes, constituída por 18 critérios em análise. Nesta etapa são avaliados os dois lados dos doentes, permitindo aferir se a doença é simétrica ou assimétrica.

Através da medição das áreas dos dois lados da SN, é interessante averiguar se existe correlação entre estes valores e a classificação clínica atribuída na parte 3 da escala MDS-UPDRS. Para tal, foi calculado o *score* de assimetria com base nos valores de áreas medidos de cada doente, através da equação 4.7.

$$Score_{assimetria} = \frac{Área_D - Área_E}{Média(Área_D, Área_E)} \quad (4.7)$$

Os valores de *score* de assimetria foram correlacionados com os índices de assimetria registados nas avaliações clínicas dos doentes. Foram igualmente correlacionados os *scores* totais da parte III com as áreas da SN medidas, a fim de se verificar se existe relação entre a severidade motora avaliada clinicamente e as áreas dos doentes.

Para ambas as correlações foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, que mede o grau de correlação entre duas variáveis. O coeficiente assume valores entre -1 e 1. O valor 1 indica uma correlação positiva perfeita, enquanto que o valor -1 indica uma correlação negativa perfeita entre duas variáveis que apresentam uma relação inversa, à medida que uma aumenta a outra diminui [53].

4.1.4 Disfunções cognitivas na Doença de Parkinson *late stage*

Na avaliação clínica dos doentes *late stage*, para além do domínio motor, foram avaliadas as funções cognitivas, a fim de se quantificar o nível de disfunção e classificar os doentes com ou sem demência. A avaliação da presença de demência foi baseada nas recomendações publicadas pela *Movement Disorder Society Task Force* [54]. Uma das escalas utilizadas na avaliação dos doentes foi a *Mini-Mental Status Examination* (MMSE). A MMSE [55] é bastante utilizada clinicamente para estimar a severidade e a progressão de disfunções cognitivas, avaliando inúmeras funções, tais como a linguagem, cálculo, orientação, entre outros.

O grau de disfunção cognitiva atribuído com a escala MMSE de cada doente *late stage* foi correlacionado com a FVH, a fim de se averiguar se existe relação entre a severidade das disfunções cognitivas e o volume do hipocampo. Para tal, foi utilizado o teste de Spearman. É um teste não-paramétrico, ideal para a reduzida amostra *late stage* do presente estudo. O coeficiente assume valores entre -1 e 1. O valor 1 indica uma correlação positiva perfeita, enquanto que o valor -1 indica uma correlação negativa perfeita [53].

4.1.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados, para a comparação dos valores das áreas da SN, razões de contraste e frações de volumes calculados, foi realizada com recurso a testes não paramétricos. Para a comparação entre dados emparelhados, como é o caso da comparação dos valores de áreas dos lados da SN ou valores de RC de cada indivíduo, utilizou-se o Wilcoxon *Ranked Test*, para averiguar se os valores são estatisticamente diferentes. Para a comparação entre grupos, tal como em análises anteriores, foram utilizados testes de

múltiplas comparações Kruskal-Wallis (KW) com correção de Bonferroni. Para ambos os testes, foram considerados significantes *p-values* inferiores a 0,05.

Todos os testes estatísticos foram realizados no programa R (Versão 3.3.1, The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

4.2 Resultados

4.2.1 Análise das áreas da SN

Os resultados do teste estatístico Wilcoxon (Tabela 4.3) indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as áreas dois lados da SN de cada indivíduo pertencente aos grupos em análise. Deste modo, foram considerados os valores médios das áreas dos dois lados na restante análise.

Tabela 4.3: Área das regiões hiper-intensas correspondentes à *substantia nigra* (SN) em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina de indivíduos saudáveis e doentes com doença de Parkinson (DP) *de novo*, doença entre 2 a 5 anos e *late stage*. *P-values* resultantes da aplicação do Wilcoxon Ranked Test às áreas dois lados da SN de cada indivíduo, que refletem diferenças estatisticamente significativas para valores inferiores a 0,05.

Grupo	Área(mm ²) mediana (<i>range</i>)	<i>p-value</i>
Controlos	40,6 (33,0 - 55,6)	0,60
DP <i>de novo</i>	27,7 (17,1 - 36,0)	0,79
DP 2 a 5	22,7 (8,6 - 46,8)	0,31
DP <i>late stage</i>	18,7 (12,5 - 26,5)	0,79

Observa-se uma tendência na redução da área da SN à medida que a DP vai progredindo. Entre os grupos Controlo e DP *de novo* não existe praticamente sobreposição dos valores de área medidos, com exceção de três casos considerados como *outliers*. Os grupos DP *de novo* e DP 2 a 5, apresentam alguma sobreposição dos valores medidos, verificando-se que as áreas medianas são bastante próximas. Os dados *late stage* estão todos incluídos na amplitude do grupo DP 2 a 5 (Tabela 4.3, Figura 4.4).

Para averiguar as diferenças estatísticas entre os grupos em análise foram realizados testes de comparações múltiplas de KW. Os respetivos resultados estão apresentados na Tabela 4.4.

Tal como referido na secção 3.2.2, foram registadas diferenças significativas entre os grupos Controlo e os grupos DP *de novo* e DP 2 a 5. Entre os dois grupos de doentes referidos não foram encontradas diferenças. Nesta análise, com a introdução do grupo DP *late stage*, foram detetadas diferenças significativas entre este grupo e os controlos saudáveis, tal como seria esperado. Entre o grupo DP *de novo* e *late stage* verificaram-se igualmente diferenças, ao contrário da comparação com o grupo DP 2 a 5 (Tabela 4.4).

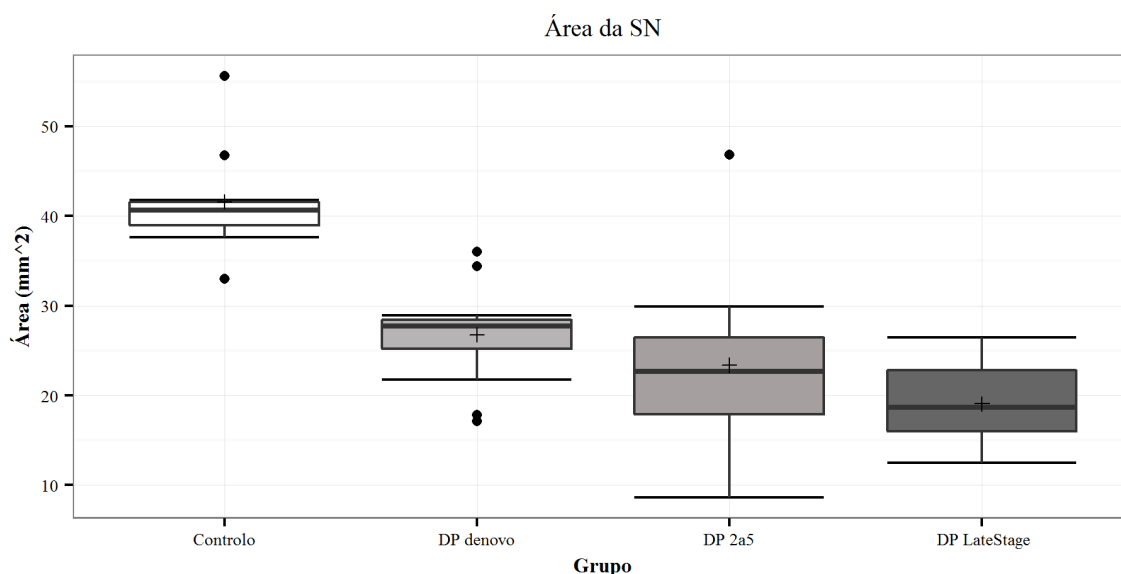


Figura 4.4: Área das regiões hiper-intensas correspondentes à *substantia nigra* (SN) em imagens de ressonância magnética sensíveis à neuromelanina, de indivíduos saudáveis (Controlo) e doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage*.

Tabela 4.4: Resultados da aplicação do teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni aos valores das áreas da *substantia nigra* de indivíduos saudáveis (Controlo), doentes com a Doença de Parkinson *de novo*, com a doença entre 2 a 5 anos e *late stage*. Diferenças estatisticamente significativas para *p-values* inferiores a 0,05.

Grupos	<i>p-value</i>
Controlos - DP 2 a 5	0,0001
Controlos - DP <i>de novo</i>	0,0020
Controlos - DP <i>late stage</i>	0,0001
DP 2 a 5 - DP <i>de novo</i>	0,6504
DP 2 a 5 - DP <i>late stage</i>	0,5244
DP <i>de novo</i> - DP <i>late stage</i>	0,0052

Foi realizada uma análise ROC para averiguar a capacidade de os doentes poderem ser distinguidos através dos valores de área da SN, medidas com o procedimento de segmentação semiautomática utilizado nesta análise.

Nas figuras 4.5, 4.6 e 4.7 estão ilustradas as curvas ROC resultantes. Na distinção entre os grupos DP *de novo* e DP 2 a 5 através dos valores das áreas da SN foi obtido um valor 67% de sensibilidade e 80% de especificidade, para um valor de *cut-off* de 27,16 mm², tendo-se obtido um valor de AUC de 0,692 (Tabela 4.5, Figura 4.5). Na análise entre os grupos DP *de novo* e *late stage* foram obtidos para um *cut-off* de 26,31 mm² os maiores valores de sensibilidade e especificidade, com 75% e 92%, respetivamente (Tabela 4.5, Figura 4.6). Entre os grupos DP 2 a 5 e *late stage* obteve-se 70% de sensibilidade e 62% de especificidade, quanto mantido um *cut-off* de 19,29 mm² com um AUC de 0,654 (Tabela 4.5, Figura 4.7).

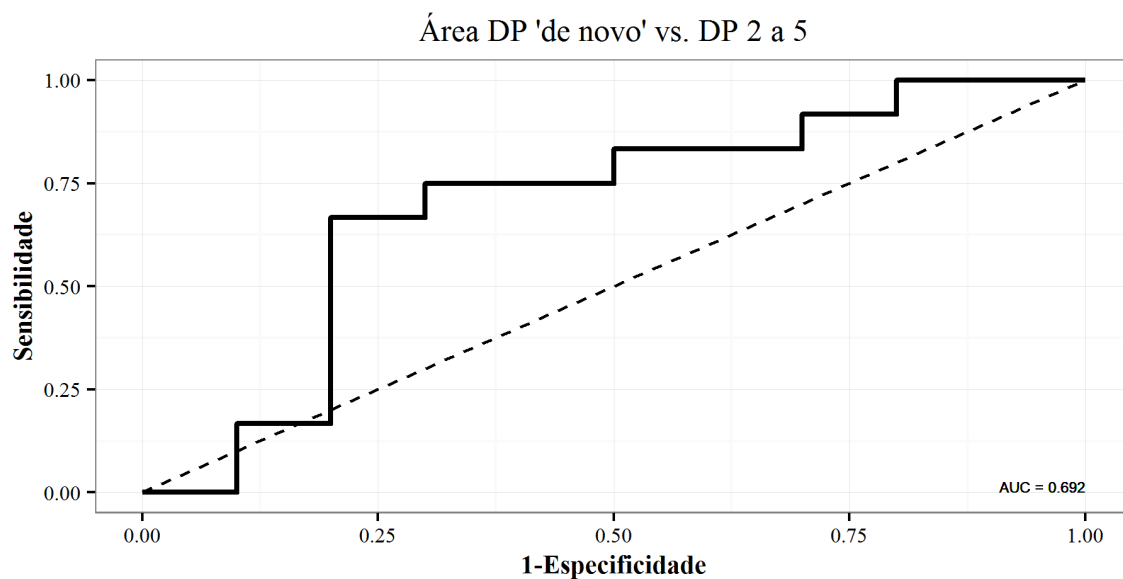


Figura 4.5: Curva *receiver operator characteristic* (ROC) das áreas da *substantia nigra* para diferenciar doentes com Doença de Parkinson *de novo* e doentes com a doença entre 2 a 5 anos de duração.

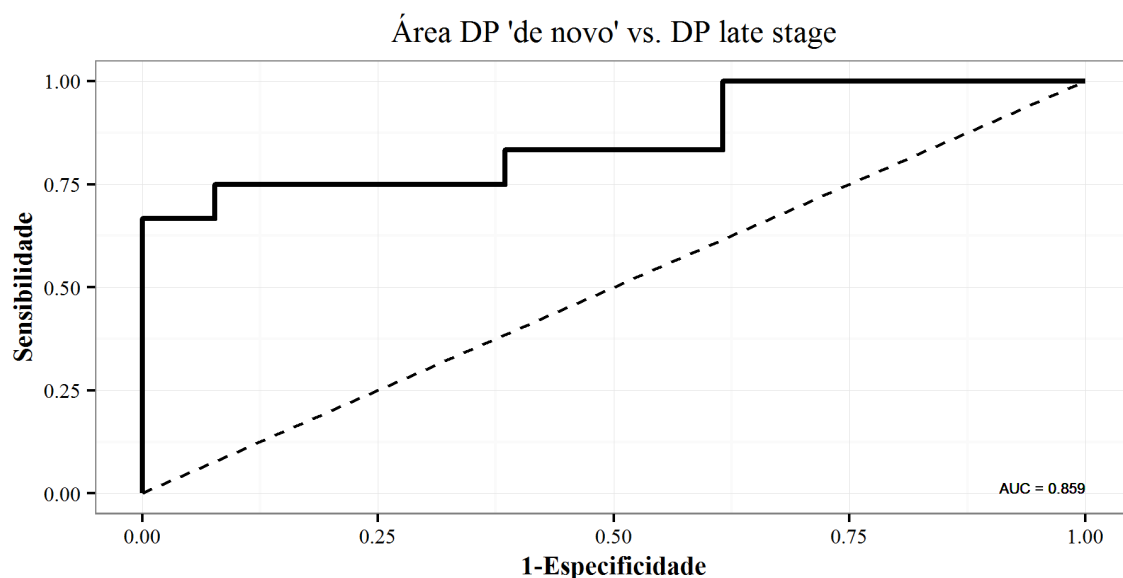


Figura 4.6: Curva *receiver operator characteristic* (ROC) das áreas da *substantia nigra* para diferenciar doentes com Doença de Parkinson *de novo* e doentes *late stage*.

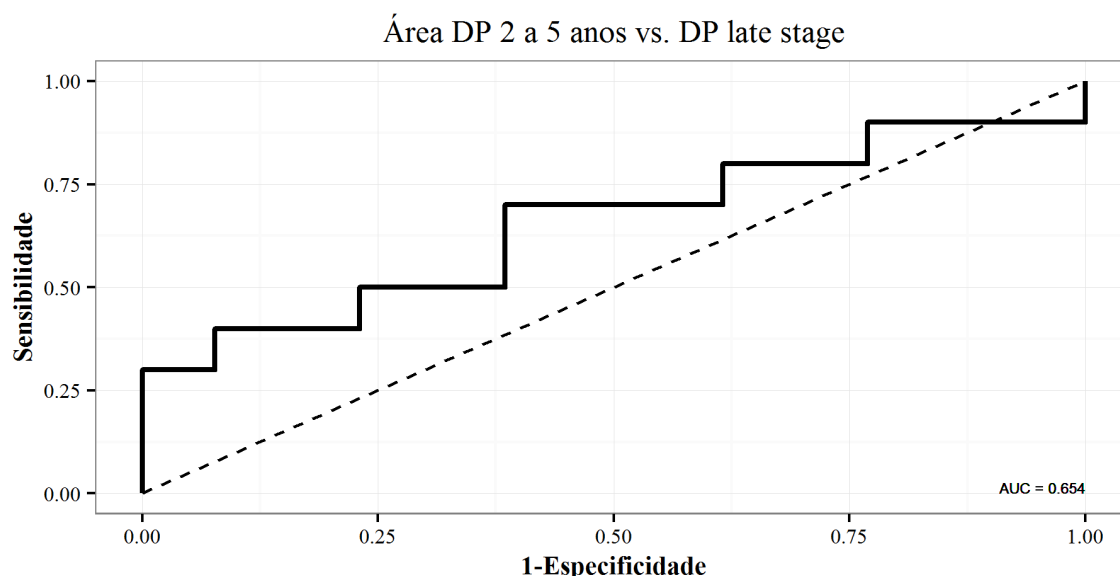


Figura 4.7: Curva *receiver operator characteristic* (ROC) das áreas da *substantia nigra* para diferenciar doentes com Doença de Parkinson entre 2 a 5 anos de duração e doentes *late stage*.

Tabela 4.5: Análise ROC aos valores das áreas medidas da *substantia nigra* para discriminação de doentes com Doença de Parkinson (DP) *de novo*, doentes com a doença entre 2 a 5 anos de duração e doentes *late stage*.

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC	<i>cut-off</i>
DP <i>de novo</i> vs. DP 2 a 5	67	80	0,69	27,2 mm ²
DP <i>de novo</i> vs. DP <i>late stage</i>	75	92	0,86	26,31 mm ²
DP 2 a 5 vs. DP <i>late stage</i>	70	62	0,65	19,29 mm ²

4.2.2 Análise das razões de contraste (RC)

Para avaliar a significância das diferenças entre os lados da SN em relação às RC calculadas, foi aplicado o teste estatístico de Wilcoxon por região (Interna e Lateral), para cada um dos grupos. Os resultados estão apresentados na tabela 4.6, indicando que o grupo DP *late stage* apresenta diferenças estatisticamente significativas nas RC entre o lado esquerdo e direito de cada uma das regiões. Os restantes grupos não apresentaram diferenças entre os lados de cada região em análise. Perante os resultados apresentados, decidiu-se fazer uma análise considerando os lados esquerdo e direito independentes.

Em relação às RC medidas para a região interna da SN, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, tendo-se obtido nos testes globais KW os *p-values* 0,068 e 0,180, para o lado direito e esquerdo, respetivamente. Na distribuição das RC da região interna da SN verificaram-se valores mais elevados no lado esquerdo em comparação com o direito, para cada grupo em análise. Em cada um dos lados, verificou-se uma tendência de redução das RC entre o grupo Controlo e os grupos DP 2 a 5 e DP *late*

CAPÍTULO 4. ESTUDOS IMAGIOLÓGICOS EM DOENTES COM DOENÇA DE PARKINSON *LATE STAGE*

Tabela 4.6: Resultados da aplicação do estatístico de Wilcoxon aos valores de razão de contraste da região interna e lateral dos dois lados da *substantia nigra* de indivíduos saudáveis e doentes com Doença de Parkinson *de novo*, com a doença entre 2 a 5 anos e *late stage*. Diferenças estatisticamente significativas para *p-values* inferiores a 0,05.

Grupos	Região Interna (<i>p-value</i>)	Região Lateral (<i>p-value</i>)
Controlo	0,432	0,375
DP <i>de novo</i>	0,052	0,151
DP 2 a 5	0,131	0,375
DP <i>late stage</i>	0,027	0,011

stage. A distribuição dos valores no grupo DP *de novo* manteve-se próxima do Controlo, verificando-se para o lado direito um aumento neste grupo DP (Figura 4.8).

Quanto à região lateral, foram obtidos os *p-values* 0,068 e 0,048 no teste global KW efetuado aos valores de RC medidos no lado direito e esquerdo, respetivamente. Perante o resultado do teste global, apenas foi detetada a presença de diferenças estatisticamente significativas nos valores de RC do lado esquerdo. No teste KW para múltiplas comparações apenas foram observadas diferenças significativas no lado esquerdo, entre os controlos e os doentes DP 2 a 5, com um *p-value* de 0,0355 (Tabela 4.7). Os valores de RC medidos do grupo DP 2 a 5 são os que se mais afastam dos do grupo Controlo. Observa-se uma tendência de aumento das RC do grupo DP *late stage* em relação ao grupo de doentes DP 2 a 5 (Figura 4.9).

Tabela 4.7: Resultados da aplicação do teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni aos valores das razões de contraste na região lateral dos lados direitos e esquerdo da *substantia nigra* de indivíduos saudáveis, doentes com Doença de Parkinson *de novo*, com a doença entre 2 a 5 anos e *late stage*. Diferenças estatisticamente significativas para *p-values* inferiores a 0,05.

Grupos	Lado direito (<i>p-value</i>)	Lado esquerdo (<i>p-value</i>)
Controlos - DP 2 a 5	0,0735	0,0355
Controlos - DP <i>de novo</i>	1,0000	0,8038
Controlos - DP <i>late stage</i>	0,5654	0,2339
DP 2 a 5 - DP <i>de novo</i>	0,3195	0,8420
DP 2 a 5 - DP <i>late stage</i>	1,0000	1,0000
DP <i>de novo</i> - DP <i>late stage</i>	1,0000	1,0000

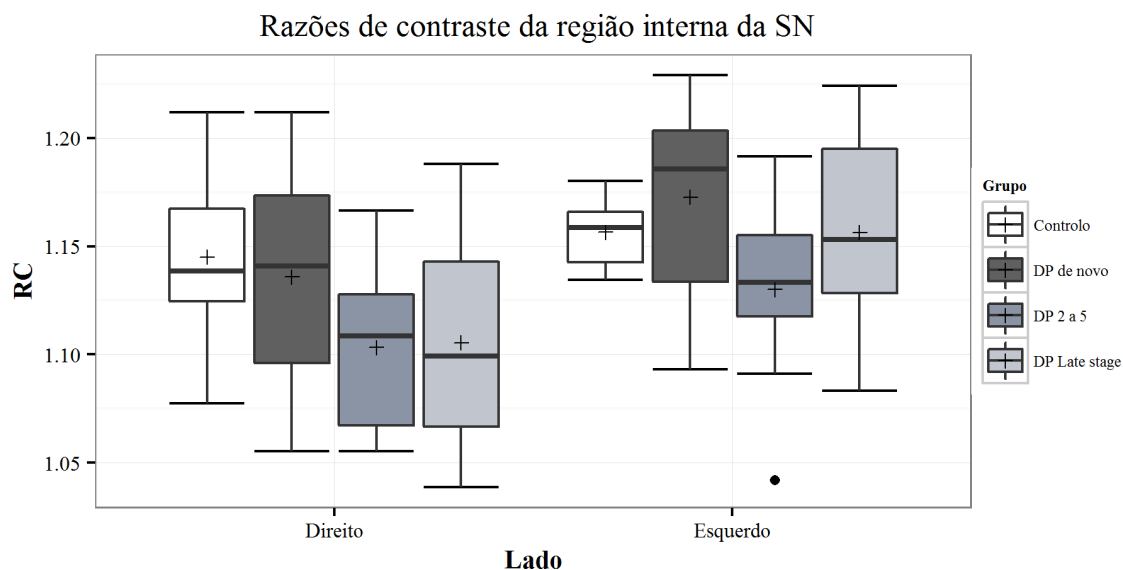


Figura 4.8: Razões de contraste (RC) na região interna dos lados (direito e esquerdo) da *substantia nigra* (SN), de indivíduos saudáveis (Controlo) e doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage*.

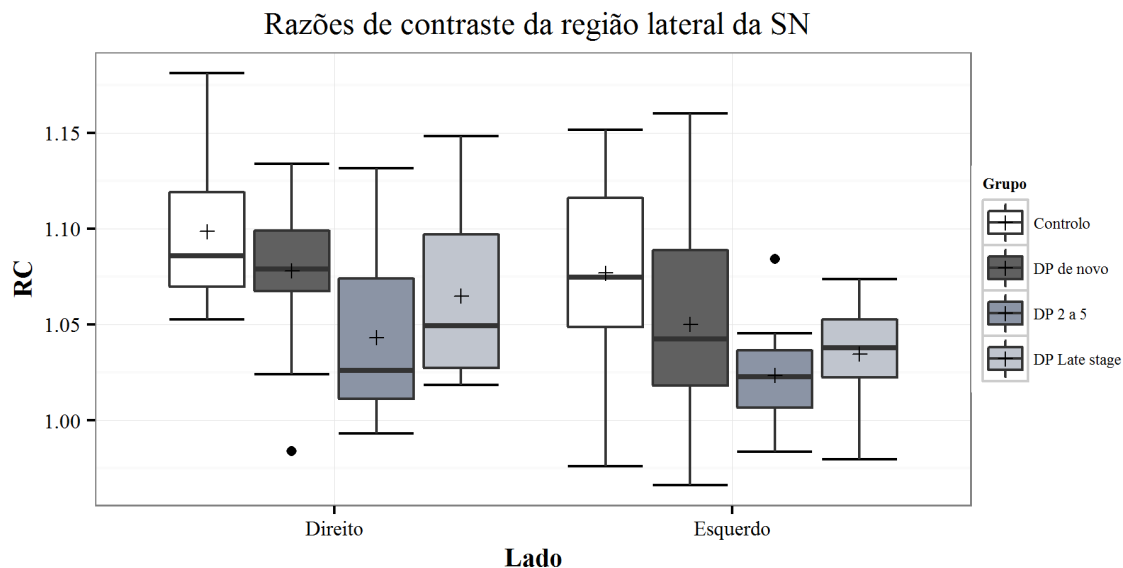


Figura 4.9: Razões de contraste (RC) na região lateral, dos lados (direito e esquerdo) da *substantia nigra* (SN), de indivíduos saudáveis (Controlo) e doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage*.

Para além da análise de resultados apresentada, decidiu-se averiguar se os valores de RC médios entre o lado esquerdo e direito, de cada uma das regiões da SN permite acrescentar alguma informação ao estudo imagiológico realizado. Na tabela 4.8 estão apresentados os resultados desta análise.

Tabela 4.8: Razões de contraste (RC) médios da região interna e lateral da *substantia nigra* de indivíduos saudáveis, doentes com Doença de Parkinson *de novo*, com a doença entre 2 a 5 anos e *late stage*.

Grupos	Região Interna	Região Lateral
	RC mediana (<i>range</i>)	RC mediana (<i>range</i>)
Controlo	1,16 (1,11 - 1,19)	1,10 (1,02 - 1,12)
DP <i>de novo</i>	1,15 (1,09 - 1,21)	1,06 (0,10 - 1,13)
DP 2 a 5	1,12 (1,05 - 1,16)	1,03 (0,99 - 1,08)
DP <i>late stage</i>	1,12 (1,09 - 1,18)	1,04 (0,10 - 1,10)

Na região interna da SN, as RC dos vários grupos são bastantes próximas umas das outras, verificando-se uma sobreposição generalizada dos dados (Figura 4.10). Foi obtido um *p-value* de 0,06 no teste global KW, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos grupos em análise.

Por outro lado, na região lateral verifica-se uma distinção mais acentuada entre os grupos, que se reflete nos valores medianos registados. O teste KW registou um *p-value* global de 0,01, indicando a presença de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Observa-se uma redução das RC entre o grupo de controlos e os grupos de doentes, destacando-se uma diferença significativa entre os indivíduos saudáveis e o grupo de doentes com DP entre 2 a 5 anos de duração, com um *p-value* de 0,008 (Tabela 4.8, Figura 4.11). Nas comparações entre os restantes grupos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. No entanto, é possível verificar uma tendência de diminuição das RC à medida que a doença evolui, observando-se um ligeiro aumento entre o grupo DP 2 a 5 e o DP *late stage* (Figura 4.11).

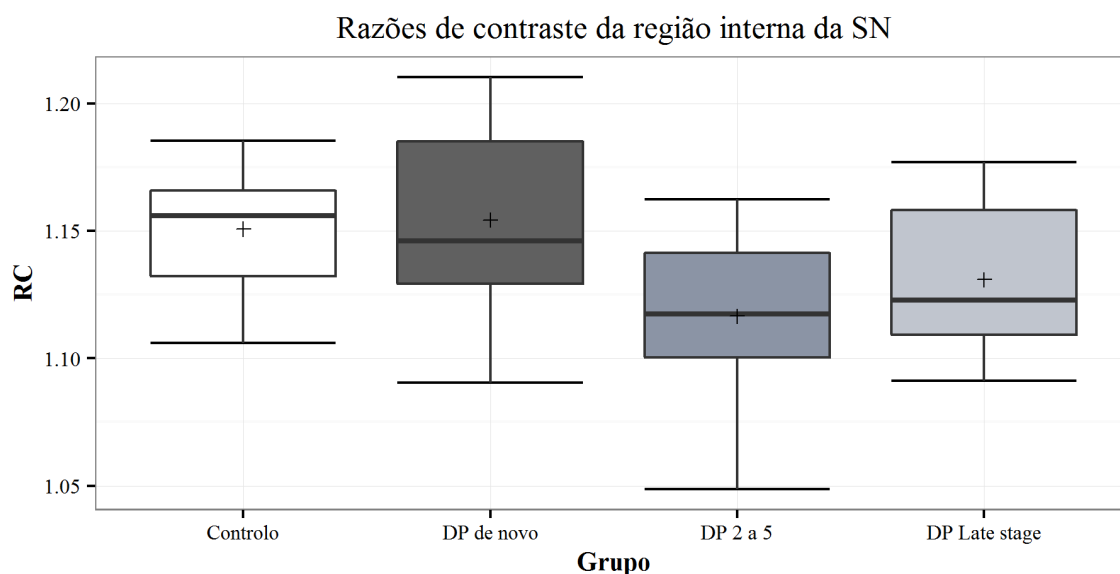


Figura 4.10: Razões de contraste (RC) na região interna da *substantia nigra* (SN), de indivíduos saudáveis (Controlo) e doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage*.

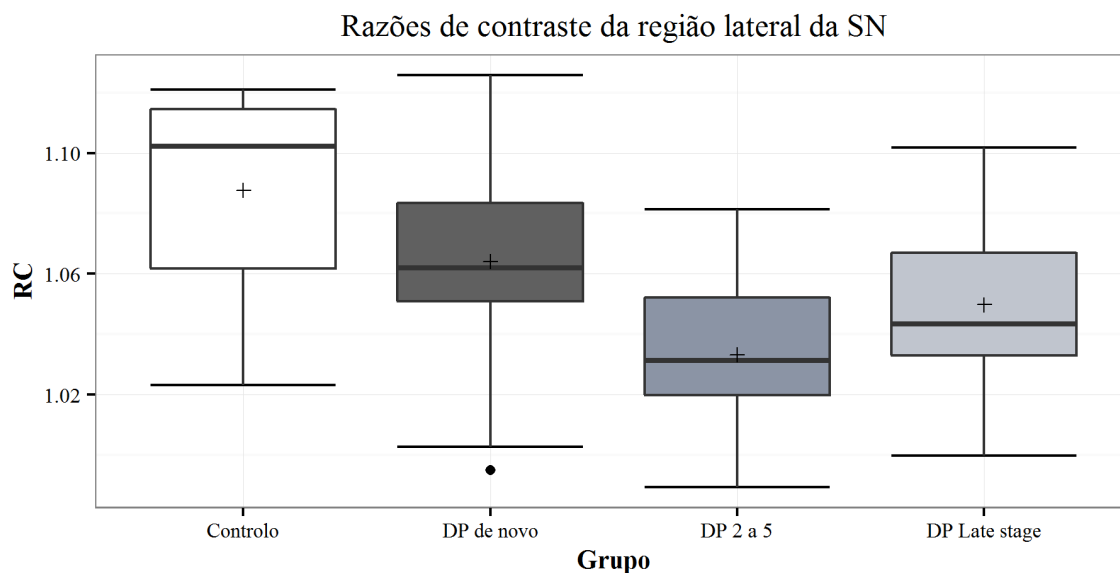


Figura 4.11: Razões de contraste (RC) na região lateral da *substantia nigra* (SN), de indivíduos saudáveis (Controlo) e doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage*.

4.2.3 Correlação da avaliação clínica com as áreas da *substantia nigra*

Os grupos de doentes em análise estão organizados por tempo de duração da doença, tendo-se até ao momento realizado testes que permitam averiguar a hipótese de que ocorre uma redução da neuromelanina ao longo dos vários estádios da DP. Um outro fator importante em ter em consideração é a severidade da doença, cujo domínio motor é avaliado na parte III da escala MDS-UPDRS. Deste modo, foi realizada uma análise para determinar a correlação que existe entre as áreas da SN e o *score* clínico total atribuído na parte III da avaliação.

Obteve-se um grau de correlação de valor -0,26 e um *p-value* de 0,14, que indica uma correlação inversa fraca, estatisticamente não significativa. A Figura 4.12 reflete a fraca correlação inversa observada, verificando-se uma ligeira tendência do aumento dos *scores* da escala MDS-UPDRS III para áreas mais baixas.

Um outro parâmetro importante para o estudo é a relação que existe entre o índice de assimetria clínico e o *score* de assimetria calculado com base na diferença entre os valores da área da SN do lado direito e esquerdo. Os valores de *score* de assimetria calculados para todos os doentes foram correlacionados com os respetivos índices de assimetria, obtendo-se um grau de correlação de valor 0,11 e um *p-value* de 0,53. Este valor reflete uma correlação fraca entre as duas variáveis em estudo, estatisticamente não significativa, permitindo-nos, numa primeira análise, afirmar que não existe uma relação direta entre o lado com área mais reduzida e o lado mais sintomático da doença (Figura 4.13).

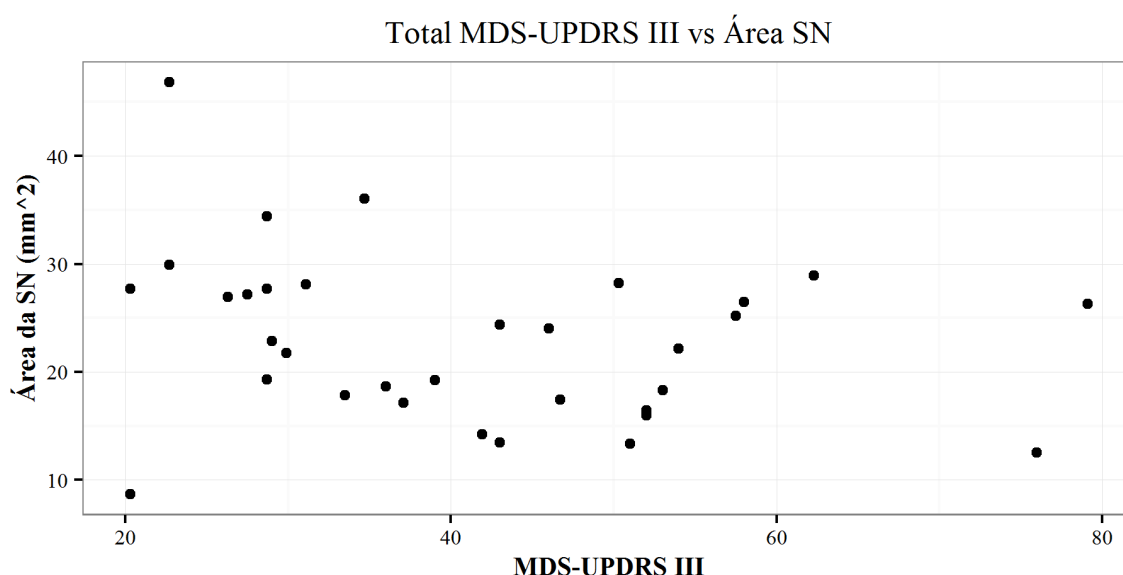


Figura 4.12: Área da *substantia nigra* (SN) em função do *score* total da escala MDS-UPDRS parte III de doentes com Doença de Parkinson *de novo*, 2 a 5 anos de duração e *late stage* indiscriminados.

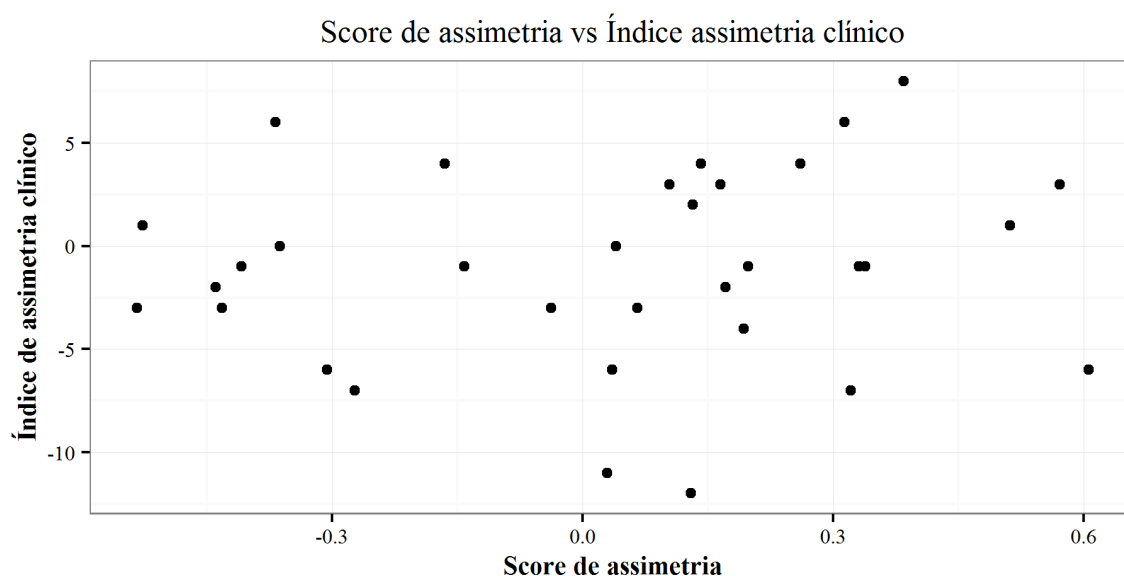


Figura 4.13: Índice de assimetria clínico avaliado na parte III da escala MDS-UPDRS em função do *score* de assimetria calculado com base na diferença das áreas dos lados da *substantia nigra* de doentes com Doença de Parkinson *de novo*, 2 a 5 anos de duração e *late stage* indiscriminados.

4.2.4 Análise volumétrica

Fração de Volume do Meséncéfalo (FVM)

O teste de KW aos valores de FVM calculados para os diferentes grupos em análise obteve um *p-value* global de 0,205, indicando a inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre grupos. Observa-se uma sobreposição generalizada entre os grupos em análise, apesar de se verificar que o grupo DP *de novo* apresenta valores de FVM tendencialmente mais baixos que o grupo Controlo, enquanto que o grupo DP 2 a 5 apresenta uma distribuição semelhante a este último. O grupo DP *late stage* apresenta o valor mediano de FVM mais baixo, sendo a maioria dos valores calculados mais baixos que os dos grupos Controlo e DP 2 a 5 (Tabela 4.9, Figura 4.14).

A correlação de Pearson entre os valores de FVM calculados e as áreas médias da SN de cada indivíduo em estudo registou um coeficiente de 0,14 com um *p-value* de 0,37, refletindo uma correlação fraca estatisticamente não significativa. A Figura 4.15 reforça o fraco valor de correlação observado, verificando-se uma elevada dispersão dos dados.

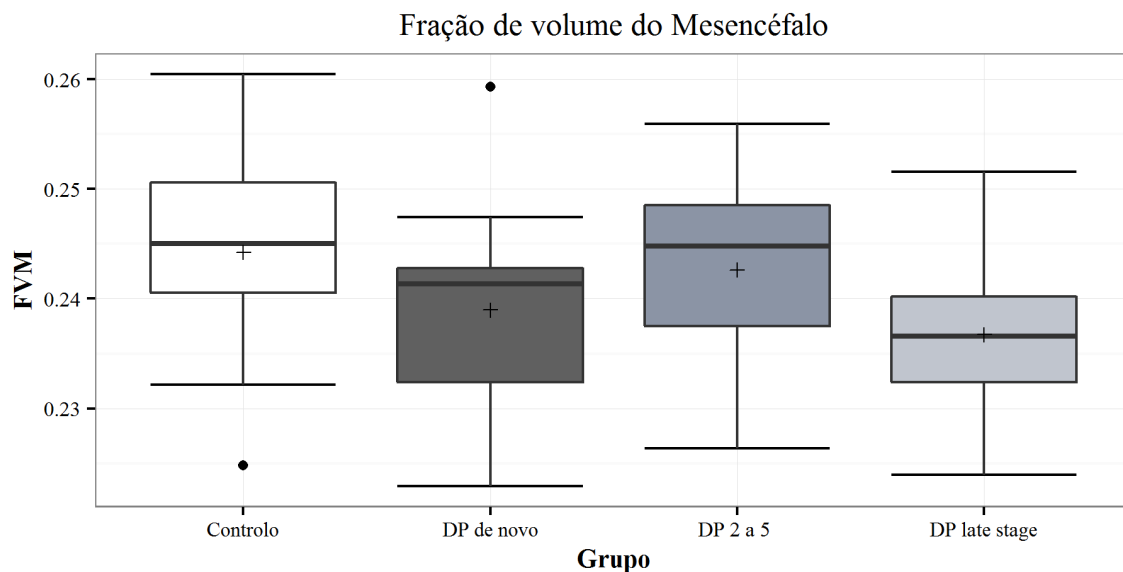


Figura 4.14: Fração de volume do mesencéfalo (FVM) calculada para indivíduos saudáveis (Controlo) doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage*.

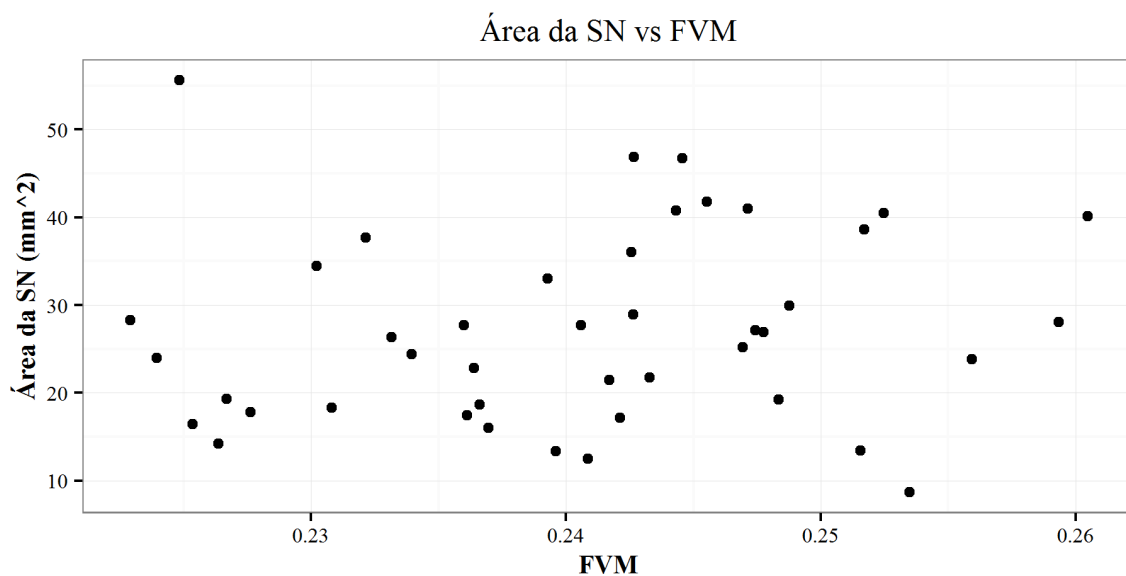


Figura 4.15: Área da *substantia nigra* em função da Fração de Volume do Mesencéfalo (FVM) de doentes com Doença de Parkinson *de novo*, 2 a 5 anos de duração e *late stage* indiscriminados.

Tabela 4.9: Fração de volume do mesencéfalo (FVM) calculada para indivíduos saudáveis (Controlo) doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage*.

Grupo	FVM mediana (<i>range</i>)
Controlos	0,245 (0,225 - 0,260)
DP <i>de novo</i>	0,241 (0,223 - 0,259)
DP 2 a 5	0,245 (0,226 - 0,256)
DP <i>late stage</i>	0,237 (0,224 - 0,252)

Fração de Volume do Hipocampo (FVH)

Quanto aos valores de FVH calculados, obteve-se um *p-value* de 0,00011 no teste global KW, indicando a presença de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Na tabela 4.10 estão apresentados os *p-values* resultantes do teste KW para comparações múltiplas com correção de Bonferroni. O grupo DP *late stage* apresenta diferenças estatisticamente significativas entre qualquer um dos restantes grupos. Entre os grupos DP *de novo* e DP 2 a 5 não foram registadas diferenças, assim como na comparação entre estes grupos de doentes e os controlos saudáveis (Tabela 4.10).

Tabela 4.10: Resultados da aplicação do teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni aos valores de fração de volume do hipocampo (FVH) calculados de indivíduos saudáveis (Controlo), doentes com a Doença de Parkinson (DP) *de novo*, com a doença entre 2 a 5 anos e *late stage*. Diferenças estatisticamente significativas para *p-values* inferiores a 0,05.

Grupos	<i>p-value</i>
Controlos - DP 2 a 5	0,6163
Controlos - DP <i>de novo</i>	0,3155
Controlos - DP <i>late stage</i>	0,0001
DP 2 a 5 - DP <i>de novo</i>	1,0000
DP 2 a 5 - DP <i>late stage</i>	0,0011
DP <i>de novo</i> - DP <i>late stage</i>	0,0008

Observa-se uma diferença bastante acentuada entre o grupo DP *late stage* e os restantes, consistentes com os resultados do teste estatístico anteriormente apresentados. Apesar de não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Controlo e o DP *de novo* e DP 2 a 5, observa-se uma tendência dos valores de FVH desses doentes serem mais baixos que os calculados para os indivíduos saudáveis, traduzindo uma ligeira atrofia do hipocampo nos estádios iniciais da DP. Por sua vez, os grupos em estádios iniciais da doença apresentaram uma distribuição nos valores de FVH semelhante (Tabela 4.11, Figura 4.16).

Tabela 4.11: Fração de volume do hipocampo (FVH) calculada para indivíduos saudáveis (Controlo) doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage*.

Grupo	FVH mediana (<i>range</i>)
Controlos	0,00263 (0,00213 - 0,00348)
DP <i>de novo</i>	0,00233 (0,00178 - 0,00288)
DP 2 a 5	0,00226 (0,00194 - 0,00335)
DP <i>late stage</i>	0,00189 (0,00120 - 0,00221)

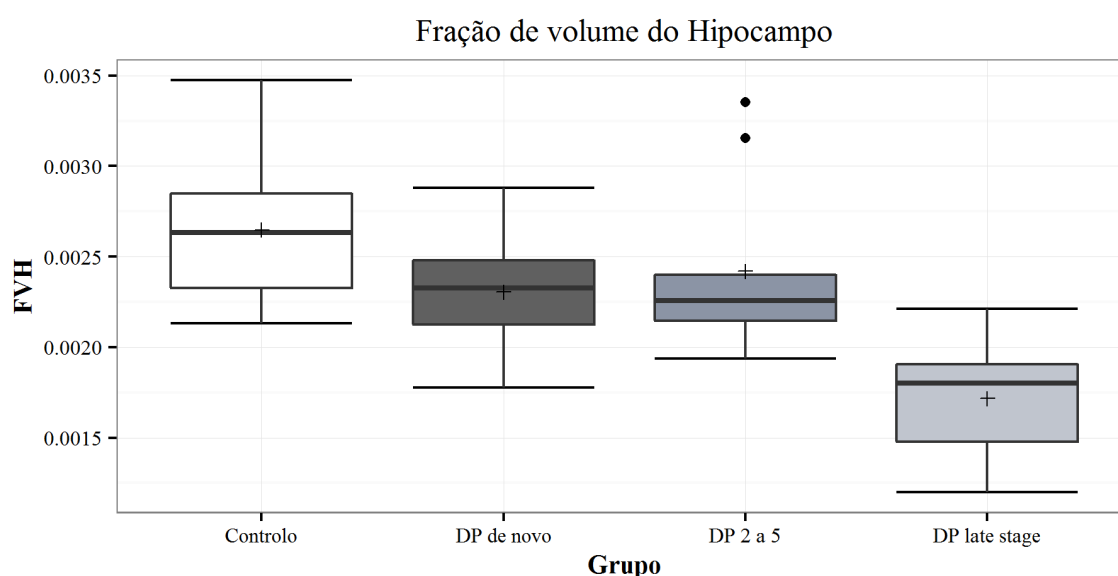


Figura 4.16: Fração de volume do hipocampo (FVH) calculada para indivíduos saudáveis (Controlo) doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage*.

O hipocampo é uma das estruturas cerebrais normalmente afetadas em situações de demência. Os doentes *late stage*, como referido, foram submetidos a uma avaliação cognitiva, sendo classificados como tendo DP com demência (7 doentes) ou sem demência (4 doentes). Deste modo, foi realizada uma outra análise aos valores de FVH com os dois subgrupos da DP *late stage* (Tabela 4.12).

Entre o grupo de doentes *late stage* com demência e os restantes grupos em análise foram detetadas diferenças estatisticamente significativas, com exceção da comparação com o grupo DP *late stage* sem demência (Tabela 4.13). De facto, são visíveis as diferenças entre os grupos, verificando-se que os dois grupos *late stage*, apresentam valores de FVH menores que os restantes, observando-se igualmente uma diferença entre o grupo com demência e sem demência (Figura 4.17). O grupo DP *late stage* apenas se diferencia estatisticamente do grupo Controlo (Tabela 4.13).

Tabela 4.12: Fração de volume do hipocampo (FVH) calculada para indivíduos saudáveis (Controlo) doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage* com e sem demência.

Grupo	FVH mediana (<i>range</i>)
Controlos	0,00263 (0,00213 – 0,00348)
DP <i>de novo</i>	0,00233 (0,00178 – 0,00288)
DP 2 a 5	0,00226 (0,00194 – 0,00335)
DP <i>late stage</i>	0,00196 (0,00156 – 0,00221)
DP <i>late stage</i> c/ demência	0,00177 (0,00120 – 0,00194)

Tabela 4.13: Resultados da aplicação do teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni aos valores de fração de volume do hipocampo (FVH) calculados de indivíduos saudáveis (Controlo), doentes com a Doença de Parkinson (DP) *de novo*, com a doença entre 2 a 5 anos e *late stage* com e sem demência. Diferenças estatisticamente significativas para *p-values* inferiores a 0,05.

Grupos	<i>p-value</i>
Controlos - DP 2 a 5	0,9995
Controlos - DP <i>de novo</i>	0,5110
Controlos - DP <i>late stage</i>	0,0082
Controlos - DP <i>late stage</i> c/ demência	0,0001
DP 2 a 5 - DP <i>de novo</i>	1,0000
DP 2 a 5 - DP <i>late stage</i>	0,2751
DP 2 a 5 - DP <i>late stage</i> c/ demência	0,0012
DP <i>de novo</i> - DP <i>late stage</i>	0,3145
DP <i>de novo</i> - DP <i>late stage</i> c/ demência	0,0010
DP <i>late stage</i> - DP <i>late stage</i> c/ demência	1,0000

Correlação da avaliação clínica cognitiva com a Fração de Volume do Hipocampo (FVH)

Para averiguar a correlação existente entre as FVH calculadas e a avaliação cognitiva clínica efetuada com a escala MMSE foi utilizado o teste de Spearman. Foi obtido um coeficiente de 0,75, com um *p-value* de 0,008, que reflete a correlação forte que existe entre as duas variáveis em análise.

Observa-se uma tendência das FVH serem menores para *scores* mais baixos da escala MMSE (Figura 4.18).

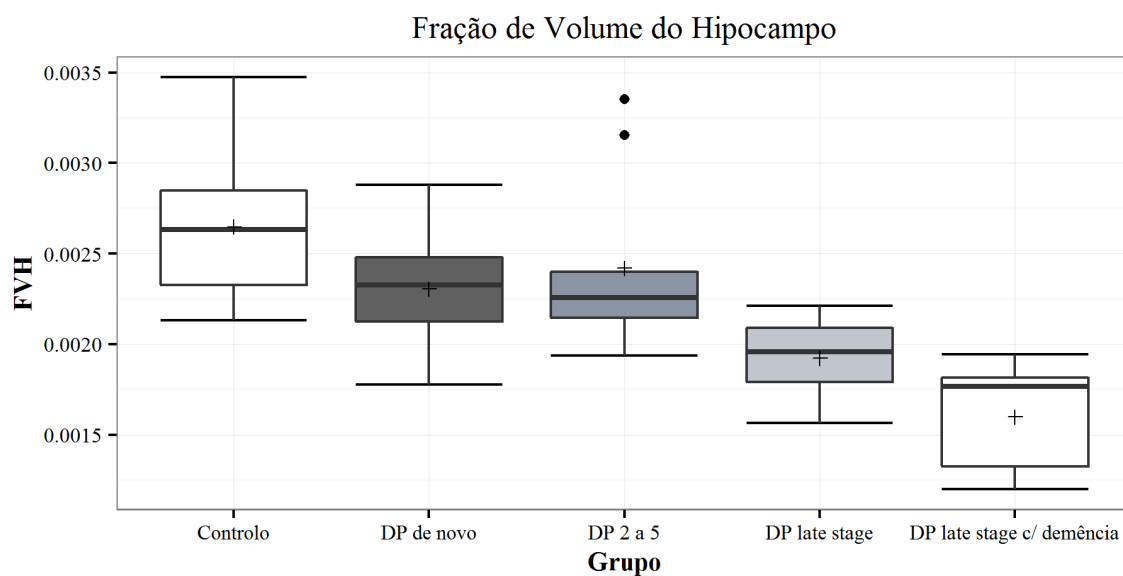


Figura 4.17: Fração de volume do hipocampo (FVH) calculada para indivíduos saudáveis (Controlo) doentes com Doença de Parkinson diagnosticados em menos de seis meses do aparecimento dos sintomas (DP *de novo*), com a doença entre 2 a 5 anos (DP 2 a 5) e doentes *late stage* com e sem demência.

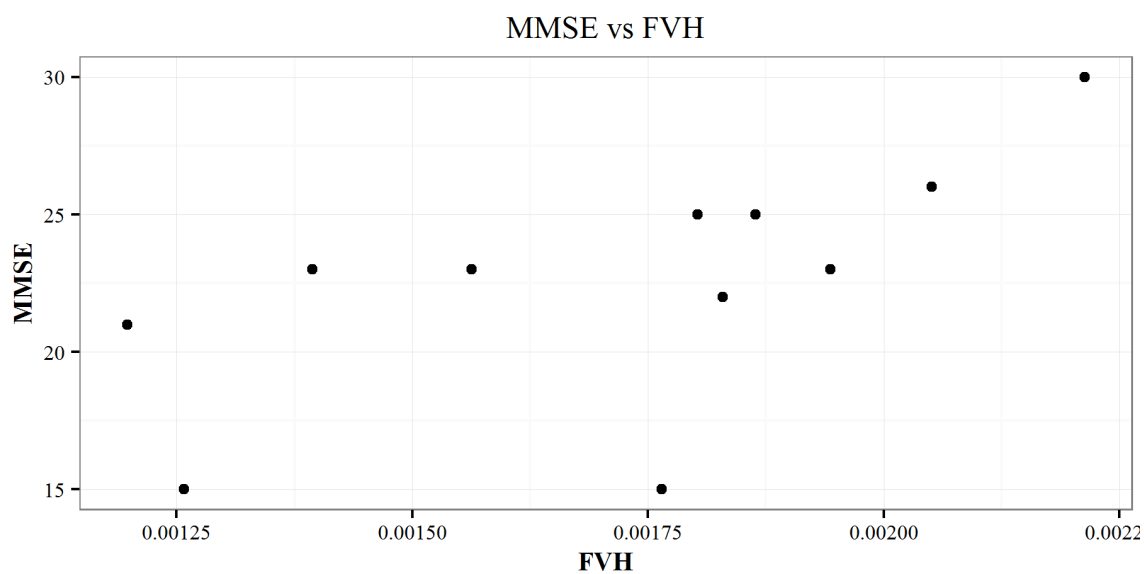


Figura 4.18: Scores da escala MMSE em função da Fração de Volume de Hipocampo (FVH) de doentes com Doença de Parkinson (DP) *late stage*.

4.3 Discussão

O presente estudo dividiu-se em duas importantes análises no contexto do estudo imagiológico da DP. Uma das análises está relacionada com a neuromelanina e a sua importância como biomarcador da doença. Pretendia-se averiguar se existem diferenças na concentração do pigmento ao longo da progressão da doença. Com recurso a uma ferramenta de segmentação semiautomática, foram medidas as áreas correspondentes ao sinal hiper-intenso da SN em imagens de RM sensíveis ao pigmento, verificando-se uma diferença considerável e estatisticamente significativa entre indivíduos saudáveis e doentes com DP, em estádios iniciais e *late stage*. Em relação aos estádios iniciais da doença, os resultados não são de todo surpreendentes, na medida em que é conhecido que os sintomas clínicos da doença são evidentes quando ocorre a perda de uma parte substancial dos neurónios dopaminérgicos da SN [28], de modo que seria expectável que se verificasse uma redução das áreas da SN nas imagens. A redução das áreas da SN dos doentes em relação às dos controlos saudáveis sugere que ocorre a morte das células neuronais constituintes dessa região cerebral. Entre os grupos DP *de novo* e DP 2 a 5 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas áreas da SN. Estes resultados são consistentes com um estudo realizado anteriormente, no qual foi igualmente utilizado um método semiautomático para medição das áreas da SN [36].

A análise a doentes *late stage* e a sua comparação com os estádios iniciais da doença, que se tenha conhecimento, não tinha sido ainda estudada. Entre este grupo de doentes e o grupo DP *de novo* observaram-se diferenças estatisticamente significativas, verificando-se que ocorre uma redução considerável das áreas entre os dois grupos. Por sua vez, em comparação com o grupo DP 2 a 5 não se observaram diferenças estatisticamente significativas, apesar de se verificar uma tendência de redução. Os resultados obtidos podem possivelmente ser explicados pela heterogeneidade elevada do grupo DP 2 a 5, ao qual pertencem doentes com uma diferença de tempo de duração da doença até 3 anos. As análises ROC realizadas permitiram evidenciar a maior discriminação nos valores de área existente entre os grupos DP *de novo* e DP *late stage*, com os valores de sensibilidade e especificidade de 75% e 92%, respetivamente. Os resultados mencionados reforçam as diferenças nas áreas da SN verificadas entre os dois grupos de doentes, enfatizando a progressiva perda neuronal que se verifica nessa estrutura no decorrer na doença.

O teste de correlação efetuado aos valores das áreas da SN medidas com o *score* clínico total da parte III da escala MDS-UPDRS traduziu uma fraca correlação observada entre as duas variáveis. O valor negativo obtido indica uma relação inversa entre as duas variáveis, indicando uma tendência de redução das áreas à medida que o *score* clínico aumenta e consequentemente a severidade da doença. O baixo valor de correlação indica que os sintomas avaliados poderão estar associados a um conjunto de fatores e não exclusivamente devido à perda neuronal da SN. Por outro lado, foi igualmente obtida uma correlação fraca entre o índice de assimetria clínico e o *score* de assimetria calculado com base na diferença entre os valores da área do lado esquerdo e direito, permitindo-nos aferir que o

lado com a área mais reduzida não é necessariamente o mais sintomático.

Para além da medição das áreas foram calculados as RC, que possibilitaram averiguar as alterações na intensidade de sinal que ocorrem nas regiões interna e lateral da SN ao longo da progressão da doença. Considerando os lados da SN independentes, apenas foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo DP 2 a 5 e o grupo Controlo para a região lateral esquerda. Para ambos os lados das duas regiões foi observado um padrão semelhante, no qual o grupo de controlos saudáveis e o grupo DP *de novo* apresentaram RC mais elevadas, verificando-se uma redução significativa nos valores calculados no grupo DP 2 a 5. No grupo *late stage* verificou-se um ligeiro aumento das RC em relação ao grupo ao DP 2 a 5, mantendo-se menores que os calculados para o grupo Controlo e DP de novo. A análise com os valores médios das RC dos dois lados da SN de cada região permitiu observar o mesmo padrão descrito, com diferenças estatisticamente significativas registadas apenas entre o grupo Controlo e o grupo DP 2 a 5. Na região lateral observa-se uma redução mais acentuada entre o grupo Controlo e os doentes com DP. O ligeiro aumento das RC observado no grupo *late stage* em relação ao grupo DP 2 a 5 pode sugerir uma possível resposta à medicação a que estes doentes estão sujeitos. Os resultados são em parte consistentes com um estudo publicado relativamente às alterações da intensidade do sinal na SN, no qual foi detetada atenuação do sinal com maior significância na região lateral da SN entre indivíduos saudáveis e doentes com DP em estágio inicial e avançado. Na região interna as diferenças encontradas foram insignificantes [32]. De facto, verificou-se uma atenuação de sinal mais acentuada na região lateral em comparação com a interna, que sugere que essa região é severamente mais afetada na DP em comparação com o envelhecimento saudável, no qual a região é relativamente preservada. É importante ter em consideração que o estágio considerado avançado nesse estudo, avaliados com a escala HY de 3-5, não é equivalente ao grupo DP *late stage* do presente estudo, que inclui doentes avaliados com a escala HY de 4-5 sob o efeito de levodopa. As RC permitem assim complementar os valores das áreas da SN medidas, revelando-se também um importante biomarcador de progressão da doença. Enquanto a medição das áreas possibilita uma maior discriminação entre diferentes estádios da doença, as RC da região lateral da SN permitem possivelmente avaliar a resposta à medicação. Para testar esta hipótese, seria interessante realizar um estudo longitudinal com doentes submetidos a alterações de medicação e/ou de dosagem ao longo do tempo, utilizando-se as RC da região lateral como medida comparativa, a fim de se averiguar como varia o sinal da SN perante essas alterações.

Outra fase dos estudos imagiológicos *in vivo* realizados prendeu-se com uma análise volumétrica efetuada a duas importantes estruturas cerebrais envolvidas na DP – o mesencéfalo e o hipocampo. Entre os valores de FVM calculados dos diferentes grupos em estudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, verificando-se uma sobreposição generalizada entre os grupos. O coeficiente de correlação fraco registado entre os valores da área da SN e os respetivos valores de FVM, assim como a inexistência de diferenças entre grupos, suportam a ideia de que as diferenças anatómicas

dessa estrutura entre sujeitos não influenciam os valores das áreas medidos, podendo estes ser comparados diretamente entre sujeitos. Num estudo publicado, no qual foram estudadas as áreas da SN de doentes com DP em fases iniciais, foi igualmente verificado que os diferentes volumes do mesencéfalo não influenciam a deteção de alterações na neuromelanina na DP [36].

Por sua vez, o hipocampo é uma estrutura que está muito associada a funções cognitivas, nomeadamente relacionadas com a memória a curto-prazo. Até ao momento, não foram efetuadas análises volumétricas a doentes *late stage*, tendo alguns autores sugerindo a hipótese de que ocorreria uma atrofia desta estrutura no decorrer da doença [42]. De facto, a DP *late stage* está relacionada com a predominância de disfunções cognitivas, sendo expetável a atrofia de estruturas do domínio cognitivo. Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de FVH do grupo *late stage* e os dos restantes grupos em análise, observando-se distribuições semelhantes entre o grupo de controlos saudáveis e os estádios iniciais da doença. No entanto, apesar de se verificar uma redução nos valores de FVH dos doentes dos grupos DP *de novo* e DP 2 a 5 em relação aos indivíduos saudáveis, não foram observadas diferenças significativas. Os resultados obtidos são em parte concordantes com estudos efetuados em estádios iniciais da doença, com e sem demência, nos quais foram observadas atrofias no hipocampo em relação a controlos saudáveis para ambos os casos. É importante ter em consideração que um dos critérios de exclusão utilizados para os grupos DP *de novo* e 2 a 5 era precisamente a presença de demência. No entanto, tal como Ibarretxe-Bilbao et al. [44] sugerem, os doentes com DP apresentam um risco de demência cinco a seis vezes superior à população geral. Apesar dos doentes das fases iniciais da amostra em estudo não serem dementes, podem apresentar propensão para tal, justificando-se assim as atrofias ligeiras registadas.

Por sua vez, o grupo *late stage* apresenta doentes diagnosticados com e sem demência, tendo-se decido efetuar uma análise tendo esse facto em consideração. O grupo *late stage* com demência apresentou diferenças estatisticamente significativas nos valores de FVH em comparação com os valores dos restantes grupos, com exceção do grupo *late stage* sem demência. O grupo *late stage* sem demência apresentou diferenças significativas em relação ao grupo Controlo, não se tendo observado outras para além das mencionadas. Apesar de não existirem estudos com doentes *late stage*, estes resultados são concordantes com estudos realizados a estádios iniciais [43, 44], tendo-se verificado a ocorrência de uma atrofia superior no hipocampo em doentes diagnosticados com demência em relação aos sem demência. Para além desta análise, foram correlacionados os valores da escala MMSE, que avalia o grau de disfunções cognitivas, com os valores de FVH, tendo-se obtido uma correlação forte de valor 0,751. Este valor permite-nos aferir que quanto menor for o grau da escala (maiores disfunções cognitivas verificadas) menor serão os volumes do hipocampo e consequentemente maior a atrofia dessa estrutura cerebral. Os resultados obtidos indicam a possibilidade de o volume do hipocampo ser um importante indicador imagiológico característico da DP *late stage*. O estudo volumétrico realizado reforça a vantagem da utilização de um *software* de segmentação automática como o Freesurfer no

ambiente clínico, cuja segmentação das estruturas cerebrais é realizada maioritariamente de forma manual.

CONCLUSÃO

5.1 Conclusões finais

O presente trabalho tinha como principal objetivo caracterizar imagiologicamente a DP e a sua evolução, com especial foco ao estágio denominado *late stage*. Perante o objetivo traçado, em primeira análise procurou investigar-se as alterações que ocorrem ao nível da concentração da neuromelanina ao longo da progressão da doença. Para tal, conseguiu delinear-se com sucesso um procedimento de segmentação, que faz uso de uma ferramenta semiautomática do OsiriX, preparada para a identificação da área correspondente ao sinal hiper-intenso da SN, em imagens sensíveis ao pigmento. O estabelecimento do procedimento final, passou por um estudo no qual foram analisados diversos filtros e testados diferentes parâmetros de segmentação do algoritmo *Confidence*. O filtro *Gaussian Blur* do OsiriX revelou ser o filtro que permite o melhor desempenho na segmentação das regiões de interesse. Quanto aos parâmetros de segmentação, o conjunto 2-multiplicador, 2-iterações e 1-raio obteve o melhor desempenho de segmentação. Como validação do procedimento arquitetado foi realizado um estudo comparativo, no qual o procedimento de segmentação otimizado foi comparado com um desenvolvido e otimizado em projetos de dissertação anteriores, na capacidade de discriminar doentes com DP de indivíduos saudáveis. O procedimento otimizado neste projeto, revelou maior sensibilidade e especificidade, com 90% e 95%, respetivamente. Este estudo permitiu não só validar a aplicabilidade da ferramenta para o estudo da DP, como permitiu reforçar a capacidade de visualização da neuromelanina com o protocolo de imagem por ressonância magnética utilizado.

O estudo imagiológico realizado, com indivíduos saudáveis e doentes com DP *de novo*, com a doença entre 2 a 5 anos e *late stage*, permitiu reforçar a importância que a medição da área do sinal hiper-intenso correspondente à neuromelanina tem no panorama geral

do diagnóstico da DP e no acompanhamento da sua evolução. Apesar de não se terem verificado diferenças significativas entre os grupos de estádios iniciais, foi observada a tendência de redução das áreas da SN à medida que a doença progride. Entre os doentes acabados de diagnosticar e os doentes *late stage* foram observadas diferenças significativas, sugerindo que a neuromelanina poderá ser um bom biomarcador de progressão da doença. Por sua vez, a medição das RC revelaram resultados interessantes, destacando-se as da região lateral da SN. O aumento da intensidade do sinal mediano da SN entre os grupos DP 2 a 5 e *late stage* sugere uma possível resposta à medicação. No entanto, é importante referir a necessidade de se realizarem mais estudos, de preferência numa maior amostra, na medida em que este é o único estudo com doentes *late stage* até ao momento.

A análise volumétrica realizada permitiu comprovar as suspeitas de que nos doentes *late stage*, cujo os sintomas passam maioritariamente por disfunções cognitivas, ocorreria atrofia do hipocampo. De facto as frações de volume do hipocampo calculadas, permitiram discriminar os doentes *late stage* dos restantes estádios, assim como de indivíduos saudáveis. Os resultados obtidos sugerem que o hipocampo poderá ser um excelente biomarcador de progressão da doença.

Encontram-se em preparação dois artigos para publicação. Um artigo incidirá sobre a aplicabilidade da ferramenta de segmentação do OsiriX, otimizada neste trabalho, para a deteção e medição das áreas da SN para diagnóstico complementar da DP. Uma outra publicação, incorporará os resultados da evolução da concentração da neuromelanina ao longo da progressão da doença no estudo da DP-LS.

5.2 Perspetivas futuras

O procedimento de segmentação otimizado neste trabalho, que faz uso de métodos do programa OsiriX, contém etapas cujo os comandos estão dispersos pelo *software*. Para uma utilização clínica mais cómoda, alguns dos passos poderão ser num trabalho futuro agrupados na forma de *plug-in*, reunidos numa única interface.

Na medida em que o estudo imagiológico realizado é pioneiro na análise de doentes com DP *late stage*, é importante ser reproduzido numa maior amostra de doentes. Seria interessante incorporar num estudo futuro estádios considerados avançados, comparando-os com os *late stage*.

A análise volumétrica realizada revelou resultados interessantes, de modo que será útil averiguar que alterações ocorrem noutras estruturas cerebrais no decorrer da doença, como por exemplo na Amígdala. Na medida em que alguns autores sugerem que os sintomas da Doença de Parkinson *late stage* se aproximam da Doença de Alzheimer, seria igualmente interessante comparar imagiologicamente esses grupos de doentes, sobretudo ao nível de estruturas diretamente associadas ao domínio cognitivo, como o Hipocampo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Parkinson Disease Foundation, *Statistics on Parkinson's*. endereço: http://www.pdf.org/en/parkinson{_}statistics (acedido em 04/02/2016).
- [2] W. Dauer e S. Przedborski, "Parkinson's Disease", *Neuron*, vol. 39, nº 6, pp. 889–909, 2003.
- [3] A. J. Stoessl, W. R. W. Martin, M. J. McKeown e V. Sossi, "Advances in imaging in Parkinson's disease", *The Lancet Neurology*, vol. 10, nº 11, pp. 987–1001, 2011.
- [4] A. Leonor, "Estudo da variabilidade dos parâmetros derivados do tensor de difusão na Doença de Parkinson e no Tremor Essencial", tese de mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, 2014.
- [5] P. Dinis, "Quantificação de Neuromelanina em Doenças Neurodegenerativas", tese de mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, 2014.
- [6] J. Pedro, "Otimização de Protocolos de Aquisição de Imagens de Ressonância Magnética Sensíveis à Concentração de Neuromelanina", tese de mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, 2015.
- [7] J. Vilar e L. Ferreira, "Quantificação da Neuromelanina", tese de mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2013.
- [8] R. C. S. Mark A. Brown, "Principles of magnetic resonance imaging", em *MRI: Principles and Applications*, 3rd, John Wiley e Sons, 2003, cap. 4, pp. 33–80, ISBN: 0-471-43310-1.
- [9] D. McRobbie, "Seeing is believing: introduction to image contrast", em *MRI: From Picture to Proton*, 2nd, New York: Cambridge University Press, 2006, cap. 3, pp. 31–36, ISBN: 9780521865272.
- [10] Center for Functional MRI, *Structural MRI Imaging*. endereço: <http://fmri.ucsd.edu/Howto/3T/structure.html> (acedido em 11/02/2016).
- [11] H. J. Johnson e M. M. McCormick, "Segmentation", em *The ITK Software Guide Book 2: Design and Functionality*, 4th, ITK, 2016, cap. 4.
- [12] N. Nikolaou e N. Papamarkos, "Color Reduction for Complex Document Images", *Wiley Periodicals*, vol. 19, pp. 14–26, 2009.

- [13] J. Manjón, P. Coupé, A. Buades e D. L. Collins, “New Methods for MRI Denoising based on Sparseness and Self-Similarity”, *Medical Image Analysis*, vol. 16, pp. 18–27, 2012.
- [14] L. Mart e D. L. Collins, “Adaptive non-local means denoising of MR images with spatially varying noise levels . Adaptive Non-Local Means Denoising of MR Images with Spatially Varying Noise Levels”, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 31, pp. 192–203, 2010.
- [15] M Sasaki, E Shibata, K Tohyama, K Kudo, J Endoh, K Otsuka e A Sakai, “Monoamine neurons in the human brain stem: anatomy, magnetic resonance imaging findings, and clinical implications”, *Neuroreport*, vol. 19, nº 17, pp. 1649–1654, 2008.
- [16] John Henkel, *Basal ganglia and relative structures*. endereço: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Basal{_}Ganglia{_}and{_}Related{_}Structures.svg (acedido em 03/10/2016).
- [17] H. Braak, K. Del, U. Rüb, R. A. I. D. Vos, E. N. H. Jansen e E. Braak, “Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson ’ s disease”, *Neurobiology of Aging*, vol. 24, pp. 197–211, 2003.
- [18] C. H. Hawkes, “The prodromal phase of sporadic Parkinson’s disease: Does it exist and if so how long is it?”, *Movement Disorders*, vol. 23, nº 13, pp. 1799–1807, 2008.
- [19] M. M. Hoehn e M. D. Yahr, “Parkinsonism : onset , progression , and mortality”, *Neurology*, vol. 17, pp. 427–442, 1967.
- [20] C. G. Goetz, W. Poewe, O. Rascol, C. Sampaio, G. T. Stebbins, C. Counsell, N. Giladi, R. G. Holloway, C. G. Moore, G. K. Wenning, M. D. Yahr e L. Seidl, “Movement Disorder Society Task Force Report on the Hoehn and Yahr Staging Scale : Status and Recommendations”, *Movement Disorders*, vol. 19, nº 9, pp. 1020–1028, 2004.
- [21] A. Samii, J. G. Nutt e B. R. Ransom, “Parkinson’s disease”, *Lancet*, vol. 363, nº 9423, pp. 1783–1793, 2004.
- [22] S. Fahn, D. Oakes, I. Shoulson, K. Kiebertz, A. Rudolph, A. Lang, C. W. Olanow, C. Tanner, K. Marek e Parkinson Study Group, “Levodopa and the progression of Parkinson’s disease.”, *The New England journal of medicine*, vol. 351, nº 24, pp. 2498–508, 2004.
- [23] M. Coelho, M. J. Marti, E. Tolosa, J. J. Ferreira, F. Valldeoriola, M. Rosa e C. Sampaio, “Late-stage Parkinson’s disease: The Barcelona and Lisbon cohort”, *Journal of Neurology*, vol. 257, nº 9, pp. 1524–1532, 2010.
- [24] a Schrag e N Quinn, “Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson’s disease. A community-based study.”, *Brain*, vol. 123 (Pt 1, pp. 2297–2305, 2000.
- [25] M Coelho e J. J. Ferreira, “Late-stage Parkinson disease”, *Nature Reviews. Neurology*, vol. 8, nº 8, pp. 435–442, 2012.

-
- [26] M. Merello, M. I. Nouzeilles, G. P. Arce e R. Leiguarda, "Accuracy of acute levodopa challenge for clinical prediction of sustained long-term levodopa response as a major criterion for idiopathic Parkinson's disease diagnosis", *Movement Disorders*, vol. 17, nº 4, pp. 795–798, 2002.
- [27] M Coelho, J Ferreira, M Rosa e C Sampaio, "Treatment options for non-motor symptoms in late-stage Parkinson's disease", *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, vol. 9, nº 4, pp. 1–13, 2008.
- [28] L Zecca, D Tampellini, M Gerlach, P Riederer, R. G. Fariello e D Sulzer, "Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour.", *Molecular pathology*, vol. 54, nº 6, pp. 414–418, 2001.
- [29] O. Hwang, "Role of oxidative stress in Parkinson's disease.", *Experimental neurobiology*, vol. 22, nº 1, pp. 11–7, 2013.
- [30] T. Mds, C. G. Goetz, W. Poewe, O. Rascol e S. Christina, "State of the Art Review The Unified Parkinson ' s Disease Rating Scale (UPDRS): Status and Recommendations", *Society*, vol. 18, nº 7, pp. 738 –750, 2003.
- [31] T. Eckert, A. Barnes, V. Dhawan, S. Frucht, M. F. Gordon, A. S. Feigin e D. Eidelberg, "FDG PET in the differential diagnosis of parkinsonian disorders", *NeuroImage*, vol. 26, nº 3, pp. 912–921, 2005.
- [32] C. Ohtsuka, M. Sasaki, K. Konno, M. Koide, K. Kato, J. Takahashi, S. Takahashi, K. Kudo, F. Yamashita e Y. Terayama, "Changes in substantia nigra and locus coeruleus in patients with early-stage Parkinson's disease using neuromelanin-sensitive MR imaging", *Neuroscience Letters*, vol. 541, pp. 93–98, 2013.
- [33] M. Sasaki, E. Shibata, K. Kudo e K. Tohyama, "Neuromelanin-sensitive MRI: Basics, technique, and clinical applications", *Clinical Neuroradiology*, vol. 18, nº 3, pp. 147–153, 2008.
- [34] X. Chen, D. E. Huddleston, J. Langley, S. Ahn, C. J. Barnum, S. A. Factor, A. I. Levey e X. Hu, "Simultaneous imaging of locus coeruleus and substantia nigra with a quantitative neuromelanin MRI approach", *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 32, nº 10, pp. 1301–1306, 2014.
- [35] M. Sasaki, E. Shibata, K. Tohyama, J. Takahashi, K. Otsuka, K. Tsuchiya, S. Takahashi, S. Ehara, Y. Terayama e A. Sakai, "Neuromelanin magnetic resonance imaging of locus ceruleus and substantia nigra in Parkinson's disease.", *Neuroreport*, vol. 17, nº 11, pp. 1215–1218, 2006.
- [36] S. Reimão, P. Pita Lobo, D. Neutel, L. Correia Guedes, M. Coelho, M. M. Rosa, J. Ferreira, D. Abreu, N. Gonçalves, C. Morgado, R. G. Nunes, J. Campos e J. J. Ferreira, "Substantia nigra neuromelanin magnetic resonance imaging in de novo Parkinson's disease patients", *European Journal of Neurology*, vol. 22, nº 3, pp. 540–546, 2015.

- [37] B Schulz, M. Skalej, D. Wedekind, A. R. Luft, M. Abele, K. Voigt, J. Dichgans e T. Klockgether, "Magnetic Resonance Imaging – Based Volumetry Differentiates Idiopathic Parkinson ' s Syndrome from Multiple System Atrophy and Progressive Supranuclear Palsy", *Annals of Neurology*, vol. 45, pp. 65–74, 1999.
- [38] E. J. Wild e N. C. Fox, "Serial volumetric MRI in Parkinsonian disorders", *Movement Disorders*, vol. 24, S691–S698, 2009.
- [39] S. Price, D. Paviour, R. Scahill, J. Stevens, M. Rossor, A. Lees e N. Fox, "Voxel-based morphometry detects patterns of atrophy that help differentiate progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease", *NeuroImage*, vol. 23, n° 2, pp. 663–669, 2004.
- [40] B. Ramírez-Ruiz, M. J. Martí, E. Tolosa, D. Bartrés-Faz, C. Summerfield, P. Salgado-Pineda, B. Gómez-Ansón e C. Junqué, "Longitudinal evaluation of cerebral morphological changes in Parkinson's disease with and without dementia", *Journal of Neurology*, vol. 252, n° 11, pp. 1345–1352, 2005.
- [41] E. J. Burton, I. G. McKeith, D. J. Burn, E. D. Williams e J. T. O'Brien, "Cerebral atrophy in Parkinson's disease with and without dementia: A comparison with Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and controls", *Brain*, vol. 127, n° 4, pp. 791–800, 2004.
- [42] C. Junqué, B. Ramírez-Ruiz, E. Tolosa, C. Summerfield, M. J. Martí, P. Pastor, B. Gómez-Ansón e J. M. Mercader, "Amygdalar and hippocampal MRI volumetric reductions in Parkinson's disease with dementia", *Movement Disorders*, vol. 20, n° 5, pp. 540–544, 2005.
- [43] R. Camicioli, M. M. Moore, A. Kinney, E. Corbridge, K. Glassberg e J. a. Kaye, "Parkinson's disease is associated with hippocampal atrophy.", *Movement disorders*, vol. 18, n° 7, pp. 784–790, 2003.
- [44] N. Ibarretxe-Bilbao, E. Tolosa, C. Junque e M. J. Marti, "MRI and cognitive impairment in Parkinson's disease", *Movement Disorders*, vol. 24, n° 2, pp. 748–753, 2009.
- [45] A Brück, T Kurki, V Kaasinen, T Vahlberg e J. O. Rinne, "Hippocampal and pre-frontal atrophy in patients with early non-demented Parkinson's disease is related to cognitive impairment.", *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 75, n° 10, pp. 1467–9, 2004.
- [46] A. Tristán-vega e V. García-pérez, "Efficient and robust nonlocal means denoising of MR data based on salient features matching", *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 105, n° 2, pp. 131–144, 2012.

-
- [47] K. H. Zou, S. K. Warfield, A. Bharatha, C. M. C. Tempany, M. R. Kaus, S. J. Haker, W. M. W. Iii e F. A. Jolesz, "Statistical Validation of Image Segmentation Quality Based on a Spatial Overlap Index", *Academic Radiology*, vol. 11, nº 2, pp. 178–189, 2004.
- [48] T. Sing, O. Sander, N. Beerenwinkel e T. Lengauer, "ROCR : visualizing classifier performance in R", *Bioinformatics*, vol. 21, nº 20, pp. 3940–3941, 2005.
- [49] P. M. G.A. Mihailoff, D.E. Haines, *The Midbrain*. endereço: <http://clinicalgate.com/the-midbrain/> (acedido em 14/09/2016).
- [50] *Freesurfer*. endereço: <http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>.
- [51] D. Pera, "Desenvolvimento de uma Interface para Avaliação de Alterações Volumétricas em Imagens de Ressonância Magnética", tese de mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, 2015.
- [52] C. G. Goetz, S. Fahn, P. Martinez-Martin et al., "Movement disorder society-sponsored revision of the unified Parkinson's disease rating scale (MDS-UPDRS): Process, format, and clinimetric testing plan", *Movement Disorders*, vol. 22, nº 1, pp. 41–47, 2007.
- [53] M. M. Mukaka, "Statistics Corner : A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research", *Malawi Medical Journal*, vol. 24, pp. 69–71, 2012.
- [54] B. Dubois, D. Burn, C. Goetz, D. Aarsland, R. G. Brown, G. A. Broe, D. Dickson, C. Duyckaerts, J. Cummings, S. Gauthier, A. Korczyn, A. Lees, R. Levy, I. Litvan, Y. Mizuno, I. G. Mckeith, C. W. Olanow e W. Poewe, "Diagnostic Procedures for Parkinson ' s Disease Dementia : Recommendations from the Movement Disorder Society Task Force", *Movement Disorders*, vol. 22, nº 16, pp. 2314–2324, 2007.
- [55] M. F. Folstein e S. E. Folstein, "MINI-MENTAL STATE: A practical state method for grading the cognitive state of patients for the clinician", *Journal of Psychiatric Research*, vol. 12, pp. 189–198, 1975.



INTERFACE DESENVOLVIDA

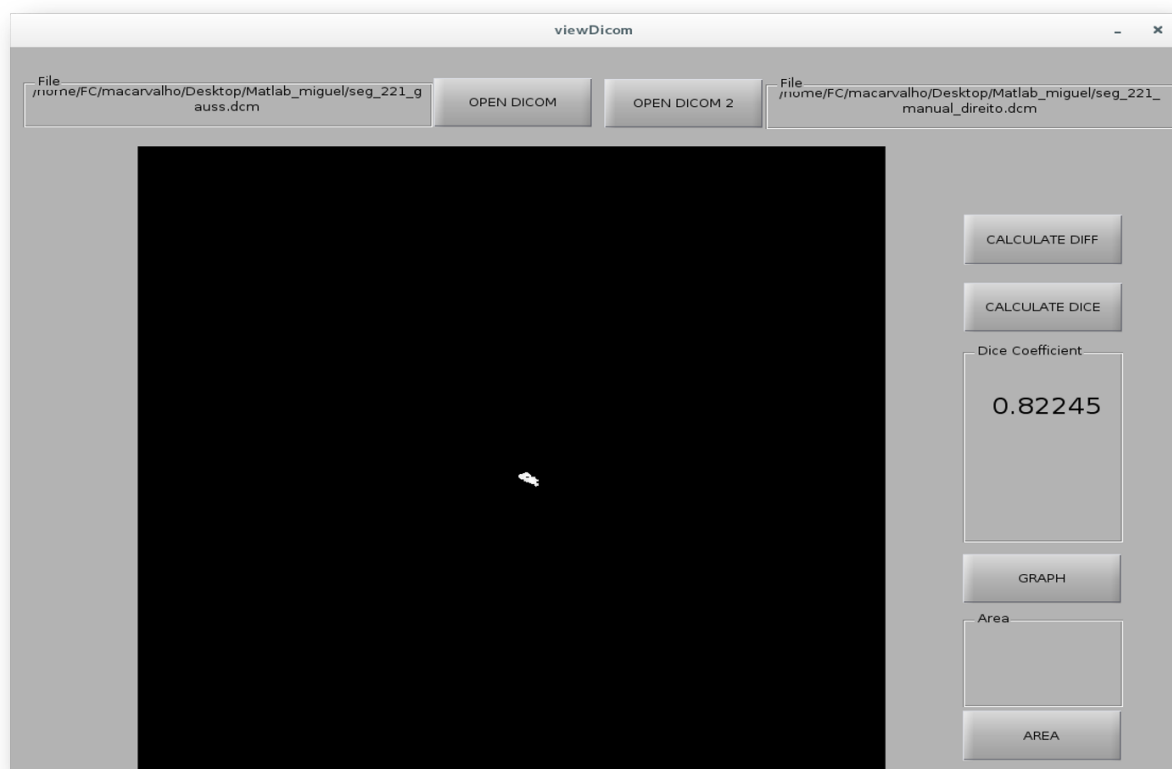


Figura A.1: Interface auxiliar (viewDicom) para cálculo do Coeficiente de Similaridade de Dice entre duas imagens DICOM. A aplicação permite abrir duas imagens, calcular o CSD, visualizar as diferenças e ainda calcular a área. Na figura é possível observar um exemplo de uma região da SN isolada (a branco) e o seu respetivo valor de Dice, calculado em relação ao respetivo controlo manual.